

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة فرحات عباس سطيف

UNIVERSITE FARHAT ABBAS –SETIF-

MEMOIRE

Présenté à la Faculté des Sciences
Département de Biologie
Pour l'obtention du Diplôme de

MAGISTER

EN BIOCHIMIE ET PHYSIOLOGIE EXPERIMENTALES

Option : Effets Biologiques des Substances Naturelles

Par :

MAMACHE WALID

THEME

**Effets du stress oxydatif *in vitro* sur la contraction du muscle
longitudinal de l'iléon de lapin**

Soutenu le : 22/06/2010

Devant le jury :

Président :	Pr. GHARZOULI Akila	Prof	Université de Sétif
Encadreur :	Pr. GHARZOULI Kamel	Prof	Université de Sétif
Examineur	Dr. DEHAMNA Saliha	M.C	Université de Sétif
	Dr. AMIRA Smain	M.C	Université de Sétif

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé et le courage pour terminer ce mémoire.

Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements au Professeur

***Kamel Gharzouli** qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je le remercie également pour sa disponibilité et son encouragement.*

Mes sincères remerciements vont également aux membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail.

Je tiens à remercier et à présenter ma profonde gratitude et reconnaissance au Dr. Benabdallah Hassiba qui m'a guidé tout au long de ce travail et pour son aide, ses précieux conseils.

L'Agence Nationale pour le Développement de la Recherche en Santé est également remerciée pour le support financier du projet de recherche.

Dédicace

Dieu tout Puissant merci pour le pouvoir et le courage que vous m'avez donné pour compléter ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

- * Ma mère pour son encouragement et bienveillance.*
- * Mon père, pour son soutien et aide.*
- * Mes frères et ma sœur chacun par son nom.*
- * Mon âme sœur pour sa patience.*
- * Ma grande et ma petite famille.*
- * A tous mes collègues d'étude spécialement Boussoualim Naouel et Messaoudi Dalila.*
- * A tous ceux qui aiment la science et la recherche scientifique.*

Walid

Résumé

Le peroxy ABAP, ABAPOO^- (0–196 μM) induit un arrêt transitoire des contractions spontanées de l'iléon de lapin *in vitro*. A la reprise de l'activité contractile, le tonus et la fréquence des contractions sont légèrement diminués alors que l'amplitude a tendance à augmenter. Le tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (0.03–1 mM) diminue le tonus basal et l'amplitude des contractions de manière dépendante de la concentration; mais la fréquence des contractions reste inchangée. L' ABAPOO^- et le t-BHP ne modifient pas significativement la contraction phasique induite par le carbachol, le KCl 80 mM ou le BaCl_2 5 mM. La contraction tonique induite par le KCl ou le BaCl_2 est significativement réduite par le t-BHP 1 mM; alors qu'elle est augmentée par l' ABAPOO^- 98 et 196 μM . En présence du vérapamil, seulement l' ABAPOO^- 196 μM est capable d'induire une reprise modérée des contractions spontanée et une réponse à l'addition du KCl ou du BaCl_2 . Le blocage des récepteurs muscariniques avec l'atropine, des récepteurs nicotiques ganglionnaires avec l'hexaméthonium et de la transmission nerveuse avec la lidocaïne diminue la durée du silence induit par l'addition de l'ABAP. Le blocage non spécifique des canaux potassiques par le tétraéthylammonium et des canaux potassiques voltage-dépendants par la 4-aminopyridine diminue légèrement la relaxation induite par l'ABAP; mais la durée du silence est diminuée par la 4-aminopyridine ou le clotrimazole. En présence de l'acide nordihydroguaiarétique (inhibiteur de la lipoxygénase), l'amplitude et la fréquence des contractions sont diminuées par l' ABAPOO^- ; alors que la quinacrine (inhibiteur de la PLA_2) diminue l'amplitude des contractions et inhibe la relaxation et le silence induits par l' ABAPOO^- . L'inhibition de la cyclooxygénase par l'indométhacine a peu d'effets. L'addition de l' ABAPOO^- abolit totalement l'augmentation du tonus (contraction) induite par l'orthovanadate et double la durée du silence.

Mots clés: composé azo, contraction, iléon, lapin, muscle longitudinal, stress oxydatif, hydroperoxyde.

الملخص

تؤدي جذور فوق الأوكسيد لجزيئة ABAP ($ABAPOO^-$) (0-196 ميكرومول/ل) إلى إيقاف التقلصات التلقائية للفانفي الأرنب بصفة عابرة في الزجاج. ينخفض توتر و تردد التقلصات قليلا أما السعة فتتميل إلى الإرتفاع. يقوم tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (0.03-1 مليهول/ل) بخفض التوتر القاعدي و سعة التقلصات بطريقة متوقفة بالتركيز؛ إلا أن تردد التقلصات لم يتغير. لم يغير $ABAPOO^-$ و t-BHP بشكل كبير التقلص المرحلي المحفز بواسطة carbachol (1 ميكرومول/ل) و KCl (80 مليهول/ل) و $BaCl_2$ (5 ميليومول/ل). يخفض t-BHP التقلص التوتري المحفز بواسطة KCl و $BaCl_2$ بشكل كبير، إلا أنه يزداد بواسطة $ABAPOO^-$ بتركيز 98 و 196 ميكرومول/ل. في وجود verapamil، يؤدي $ABAPOO^-$ (196 ميكرومول/ل) إلى استئناف متوسط للتقلصات التلقائية و استجابة لإضافة KCl أو $BaCl_2$. يؤدي تثبيط كل من المستقبلات المسكارينية بواسطة atropine و المستقبلات النيكوتينية العقدية بواسطة hexamethonium و النقل العصبي بواسطة lidocaine إلى تقليص مدة السكون الذي يسببه ABAP. يؤدي التثبيط غير النوعي لقنوات البوتاسيوم بواسطة tetraethylammonium و قنوات البوتاسيوم المنظمة بالجهد بواسطة 4-aminopyridine إلى انخفاض طفيف في الاسترخاء المحدث بواسطة ABAP؛ إلا أن مدة السكون تنخفض بواسطة 4-aminopyridine أو clotrimazole. في وجود acid nordihydroguaiaretic (مثبط lipoxygenase)، تنخفض سعة و تردد التقلصات بواسطة $ABAPOO^-$ ؛ بينما يقوم quinacrine ($phospholipase A_2$) بخفض سعة التقلصات و تثبيط الاسترخاء و السكون المحدثين بواسطة $ABAPOO^-$. لم يظهر indomethacin (مثبط cyclooxygenase) تأثيرات معتبرة. إن إضافة $ABAPOO^-$ تلغي التقلص المحدث بواسطة orthovanadate و تضاعف مدة السكون.

الكلمات المفاتيح: مركبات azo، التقلص العضلي، اللفانفي، الأرنب، العضلات الطولية، الكرب التأكسدي، فوق أكسيد الهيدروجين.

Abstract

In vitro, peroxy ABAP, ABAPOO⁻ (0–196 μM) led to a transient arrest of the spontaneous contractions of the rabbit ileum. Basal tone and frequency of the contractions were lightly diminished while amplitude tended to increase during the period of recovery. Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) (0.03–1 mM) decreased the basal tone and amplitude of the contractions in a dependent-concentration way; but the frequency of contractions remained unchanged. The phasic contraction induced by carbachol, KCl 80 mM or BaCl₂ 5 mM was not significantly modified by both ABAPOO⁻ or t-BHP. The tonic contraction induced by KCl or BaCl₂ was significantly reduced by t-BHP 1 mM; whereas it was increased by ABAPOO⁻ 98 and 196 μM. In the presence of verapamil, only ABAPOO⁻ 196 μM induced a moderate recovery of rhythmic activity and gave a response to KCl or BaCl₂. The blockade of muscarinic receptors with atropine, ganglion nicotinic receptors with hexamethonium and of nervous transmission with lidocaine decreased the duration of the silence induced by ABAP. The nonspecific blockade of potassium channels by tetraethylammonium and the blockade of voltage-dependent potassium channels by 4-aminopyridine decreased lightly the relaxation induced by ABAP; the duration of silence was decreased by 4-aminopyridine or clotrimazole. The amplitude and frequency of spontaneous contractions were decreased by ABAPOO⁻ in the presence of nordihydroguaiaretic acid (lipoxygenase inhibitor), whereas quinacrine (PLA₂ inhibitor) decreased the amplitude of contraction and inhibited the relaxation and silence induced by ABAPOO⁻. Cyclooxygenase inhibition by indomethacin had little effect. ABAPOO⁻ abolished completely the increase of basal tone (contraction) induced by orthovanadate and prolonged the contraction arrest.

Key words: azo compounds, contraction, ileum, rabbit, longitudinal muscle, oxidative stress, hydroperoxide.

Liste des abréviations

ABAP: 2,2'-azobis (2-amidinopropane)	NDGA: Nordihydroguaiarétique acid
ABAPOO[•]: Peroxyl ABAP	NO: Nitric oxyde
4-AP: 4-aminopyridine	NOS: Nitric oxide synthase
5-HT: 5-hydroxytryptamine, serotonine	eNOS: Endothelial nitric oxide synthase
ACh: Acetylcholine	iNOS: Induced nitric oxide synthase
AChT: Acetylcholine transferase	nNOS: Neural nitric oxide synthase
BK : Large conductance potassium channels	O₂^{•-}: Superoxide anion
CMMC: Colonic migrating motor complex	OH[•]: Hydroxyl radical
cpm: Contraction par minute	ODQ: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one
DAG: Diacylglycerol	PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
DHP: Dihydropyridine	PGF: Prostaglandin F
DMPP: Dimethyl phenylpiperazinium	PGI: Prostaglandin I
GEF: Guanyl exchange factor	PIP2: Phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate
GRP: Gastrin releasing peptide	PKA: Proteine Kinase A
H₂O₂: Hydrogene peroxyde	PKG: Proteine Kinase G
HNE: 4-hydroxy-2-nonenal	PP1c: Proteine phosphatase type 1 catalytic subunit
HOCl: Hypochloreous acid	RGS: Regulator of G protein signalling
ICC: Interstitial Cajal Cells	ROK: Rho kinase
IMMC: Ileal migrating motor complex	ROS: Reactiv oxygene species
IP₃: Inositol 1,4,5 triphosphate	SERCA: Sarco endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
K_{Ca}²⁺ : Ca ²⁺ activated K ⁺ channels	SK : Small conductance potassium channels
K_v : Voltage-dependant K ⁺ channels	SNP: Sodium nitroprussiate
L-NAME: N-méthyl-L-arginine ester	SOD: Superoxide dismutase
L-NNA: N ^G -nitro-L-arginine	t-BHP: tert-butyl hydroperoxyde
MLC₂₀: Myosine light chaine 20 KDa	TEA: Tetraethylammonium
MLCK: Myosine light chaine Kinase	TK: Tachykinine
MLCP: Myosine light chaine Phosphatase	TTX: Tétrodotoxine
MMC: Migrating motor complex	VIP: Vasoactif intestinal peptide
MYPT1: MLCP target subunit	
NANC: Non adrenergic non cholinergic	

Résumé

المخلص

Abstract

Introduction 1

Etude bibliographique

1. Organisation histologique du tube digestif	3
2. Le système nerveux du tube digestif	4
2.1. Le système nerveux autonome	4
2.2. L'innervation extrinsèque	4
2.3. L'innervation intrinsèque.....	5
2.3.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques (NAPI).....	5
2.3.2. Les neurones efférents	6
2.3.3. Les interneurones	7
3. Les cellules interstitielles de Cajal.....	7
4. La motilité intestinale	8
5. La contraction musculaire.....	10
5.1. Les neurotransmetteurs du muscle lisse intestinal	12
5.2. La signalisation intracellulaire de la contraction	14
6. Les radicaux libres	17
6.1. Rôles physiologiques des radicaux libres	18
6.2. La formation des radicaux libres.....	18
6.3. Les systèmes antioxydants	19
6.3.1. Le système antioxydant enzymatique	19
6.3.2. Les antioxydants non enzymatiques	20
6.4. Les dommages induits par les radicaux libres	20
6.5. Le stress oxydatif et la contraction musculaire.....	21
6.5.1. Effets de l'inflammation	21
6.5.2. Effets de l'ischémie et la reperfusion.....	22
6.5.3. Effets de l'ABAP	22
6.5.4. Effets des espèces réactives de l'oxygène	22

Matériels & méthodes

1. Préparation et mise en place des bandelettes	25
2. Protocoles expérimentaux	27
2.1. Effet de l'ABAP sur la contraction spontanée de l'iléon.....	27
2.2. Effet du t-BHP sur la contraction spontanée de l'iléon	27
2.3. Effet de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction stimulée	27
2.3.1. La contraction induite par le KCl ou le BaCl ₂	27
2.3.2. La contraction induite par la stimulation électrique	28
2.4. Etude pharmacologique de la réponse du muscle lisse à l'ABAP.....	28
2.4.1. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse	29
2.4.2. Effet de l'isoprotérénol	29
2.4.3. Effets des antagonistes des canaux potassiques.....	29
2.4.4. Effet de la déplétion des réserves du Ca ²⁺	29
2.4.5. Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique	29
2.4.6. Inhibition des tyrosines phosphatases	30
3. Evaluation de la contraction de l'iléon	30
4. Produits chimiques et solutions utilisées	31
5. Analyses statistiques.....	32

Résultats

1. Activité contractile spontanée	34
2. Effets de l'ABAP sur la contraction spontanée	34
2.1. Le silence et le tonus	34
2.2. L'amplitude	38
2.3. La fréquence	38
3. Effets du tert-butyl hydroperoxide sur la contraction spontanée.....	40
4. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction stimulée	41
4.1. Contraction induite par le carbachol.....	41
4.2. Contraction induite par la stimulation électrique	42
4.3. Contraction induite par le KCl et le BaCl ₂	44

<u>Sommaire</u>	<u>iii</u>
- Effet du t-BHP.....	45
- Effets de l'ABAP	46
- Effet de la combinaison peroxy ABAP / vérapamil.....	48
5. Etude pharmacologique de la réponse du muscle lisse à l'ABAP.....	53
5.1. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse.....	53
5.2. Effet de l'isoprotérénol.....	55
5.3. Effets des antagonistes des canaux potassiques	56
5.4. Effet de la déplétion des réserves calciques	60
5.5. Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique.....	60
5.6. Inhibition des tyrosines phosphatases	62

Discussion

1. La contraction musculaire spontanée	65
1.1. Effet de la mobilisation du calcium.....	65
1.2. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse.....	66
1.3. Influence de l'isoprotérénol.....	66
1.4. Effets des antagonistes des canaux potassiques	67
1.5. Effets des inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique	68
1.6. Effet de l'orthovanadate	68
2. La contraction musculaire stimulée.....	69
2.1. La contraction induite par le carbachol	69
2.2. La contraction induite par le KCl et le BaCl ₂	69
2.3. La contraction induite par la stimulation électrique	70
3. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction spontanée.....	70
4. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction induite.....	73
Conclusions et perspectives.....	75
Références bibliographiques.....	Erreur ! Signet non défini.

Introduction

Les contractions musculaires de l'appareil gastro-intestinal jouent un rôle important dans la digestion et l'absorption des aliments. Ces contractions assurent le mélange des aliments digérés avec les sécrétions intestinales et leur propagation le long du tube digestif. Les cellules musculaires lisses du tube digestif, chez les espèces animales et même chez l'homme, génèrent trois types de contractions: des contractions phasiques rythmiques, des contractions géantes migrantes et des contractions toniques. La fréquence maximale et le temps d'occurrence de ces contractions sont réglés par des changements réguliers dans le potentiel membranaire (ondes lentes). Les ondes lentes induisent l'ouverture des canaux calciques membranaires permettant l'entrée du calcium dans la cellule, conduisant à des cascades d'évènements pour induire la contraction musculaire. Les contractions phasiques et les ondes lentes sont souvent réglées par la libération des neurotransmetteurs excitateurs (l'acétylcholine, les tachykinines, la sérotonine) et inhibiteurs (le monoxyde d'azote, l'ATP et le VIP par le système nerveux entérique. Les neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs libérés dans les terminaisons nerveuses vont se fixer sur leurs récepteurs spécifiques localisés à la surface des cellules musculaires pour induire la contraction ou la relaxation du muscle.

Les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène jouent un rôle important dans la médiation de plusieurs processus physiologiques de la cellule. Ces radicaux sont impliqués dans la régulation du tonus des vaisseaux, la régulation des fonctions qui sont contrôlées par la concentration de l'oxygène et l'activation du signal de transduction à partir d'une variété des récepteurs membranaires. L'excès des radicaux libres peut conduire à des dommages fonctionnels et pathologiques de la cellule, cela est induit par un état avancé de stress oxydant. De plus, l'effet toxique des radicaux libres peut conduire à la mort cellulaire. Les dommages induits par les espèces réactives et les radicaux libres touchent en grande partie les protéines, les lipides membranaires et l'ADN qui peuvent influencer l'activité contractile des muscles lisses, incluant ceux de l'intestin.

Plusieurs études ont montré que les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène induisent une contraction du muscle lisse de différentes préparations tissulaires, cette contraction est parfois suivie par une relaxation. Dans certains cas, les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène induisent une relaxation du muscle lisse (Matyas et al., 2002; Rekalov et al., 2003). Le mécanisme qui démontre la relation entre le stress oxydant induit par les radicaux libres et la contraction ou la relaxation du muscle lisse n'est pas bien défini.

Le but de cette étude est de déduire les changements de l'activité contractile de l'iléon induits par un générateur des radicaux peroxy (ABAP) et un hydroperoxyde organique (tert-butyl

hydroperoxyde) en utilisant des bandelettes longitudinales du muscle lisse.

Dans la présente étude, les travaux réalisés ont consisté à:

- Evaluer l'effet de différentes concentrations du tert-butyl hydroperoxyde et des radicaux peroxylys issus de la décomposition thermique de l'ABAP sur la contraction spontanée et induite des bandelettes du muscle longitudinale de l'iléon.
- Evaluer le rôle possible des canaux calciques de type L dans l'effet du peroxylyl ABAP sur la contraction induite du muscle lisse.
- Etudier la pharmacologie de la réponse du muscle lisse à l'ABAP.

Etude

bibliographique

1. Organisation histologique du tube digestif

La paroi du tube digestif comprend quatre couches fondamentales qui sont la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Fig.1) (Daniel et al., 2001).

En général, la musculuse comprend deux couches de muscles lisses. Une couche mince, externe de cellules arrangées le long du tube digestif, forme le muscle lisse longitudinal. Perpendiculairement, une autre couche de cellules, plus épaisse, forme le muscle lisse circulaire (Hasler, 2006). L'épaisseur des deux couches varie selon l'espèce et la région du tractus gastro-intestinal. Chez certaines espèces et dans certaines parties du tube digestif, la couche musculaire circulaire est divisée en une fine couche interne et externe (Olsson et Holmgren, 2001). Le plexus nerveux ganglionnaire, plexus myentérique (plexus d'Auerbach), est située entre la couche longitudinale et la couche circulaire; par contre, les deux couches circulaires internes et externes sont séparées par le plexus nerveux non ganglionnaire, le plexus musculaire profond (Furness, 2006). Sur la partie interne de la couche des muscles circulaires se trouve la sous-muqueuse, elle est formée de tissu conjonctif qui relie la muqueuse à la musculuse. Elle est richement vascularisée et contient une partie du plexus nerveux sous-muqueux ou plexus de Meissner, les fibres du système nerveux autonome qui innervent la musculaire muqueuse. Une autre couche fine, appelée la musculaire muqueuse, sépare la muqueuse de la sous-muqueuse (Fig.1). L'épaisseur de cette couche varie en fonction de l'espèce et de la région du tube digestif (Furness, 2006).

Généralement, les cellules musculaires lisses sont des cellules longues et minces avec un grand noyau central, leurs propriétés morphologiques et physiologiques diffèrent selon l'espèce, la région du tube digestif et la position dans la couche musculaire (Olsson et Holmgren, 2001). Les cellules musculaires lisses communiquent entre elles par des jonctions communicantes et plus particulièrement celles qui forment la couche musculaire circulaire (Daniel et al., 2001).

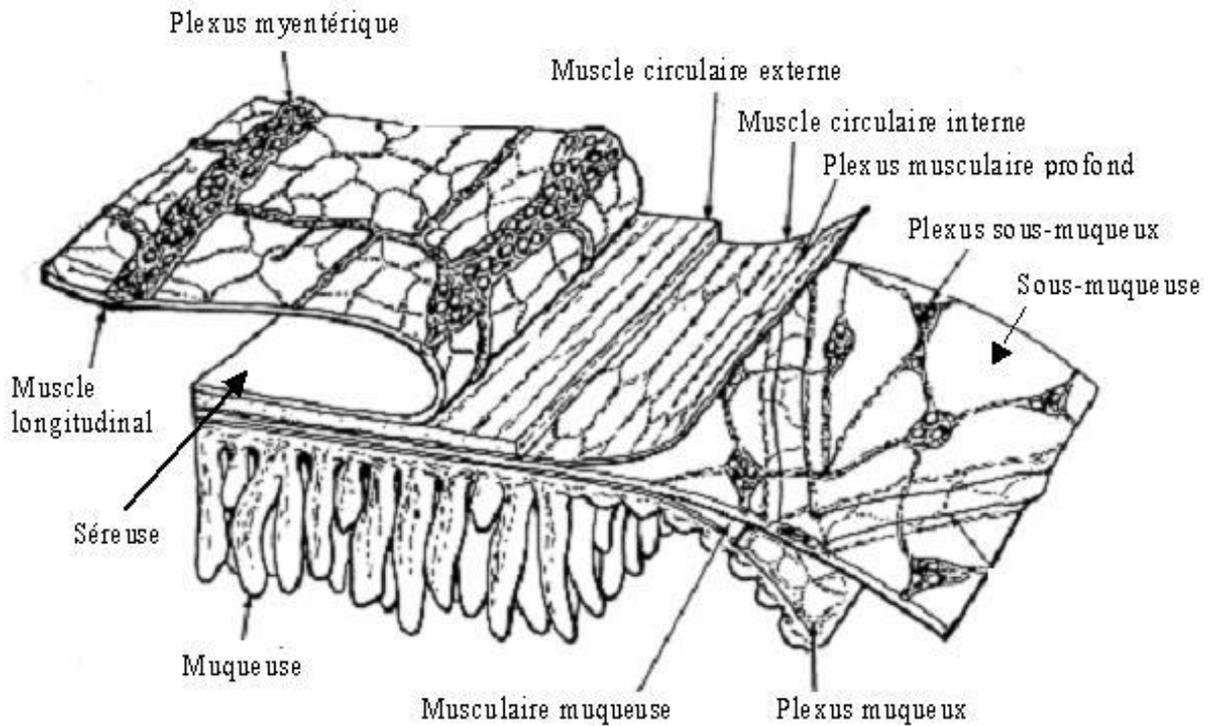


Figure 1. Histologie de la paroi intestinale (Daniel et al., 2001).

2. Le système nerveux du tube digestif

2.1. Le système nerveux autonome

Le système nerveux autonome peut être divisé en trois grandes divisions, le système nerveux sympathique, le système nerveux parasympathique et le système nerveux entérique. Ce dernier est considéré comme la troisième division du système autonome et un système intrinsèque du tube digestif (Olsson et Holmgren, 2001).

2.2. L'innervation extrinsèque

L'innervation extrinsèque du tube digestif implique le nerf crânien X ou nerf vague, pour l'estomac et l'intestin supérieur, les nerfs splanchniques pour l'estomac et l'intestin et le nerf pelvien pour l'intestin distal (Fig. 2) (Blackshaw et Gebhart, 2002).

Les voies motrices parasympathiques comprennent les branches du nerf vague qui contrôlent la motilité et la sécrétion de l'intestin supérieur, les nerfs parasympathiques sacrés qui contrôlent les fonctions du côlon distal. Les nerfs splanchniques sont sympathiques et leurs corps cellulaires localisés dans les racines ganglionnaires dorsales (Olsson et Holmgren, 2001).

2.3. L'innervation intrinsèque

Le système nerveux entérique est constitué de deux composants majeurs: le plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) et le plexus myentérique (plexus d'Auerbach) (Fig. 1). Le rôle du SNE est important dans la coordination entre les couches musculaires (Furness, 2006). Le système nerveux entérique contient des neurones afférents primaires, des motoneurones et des interneurones (Furness et Sanger, 2002).

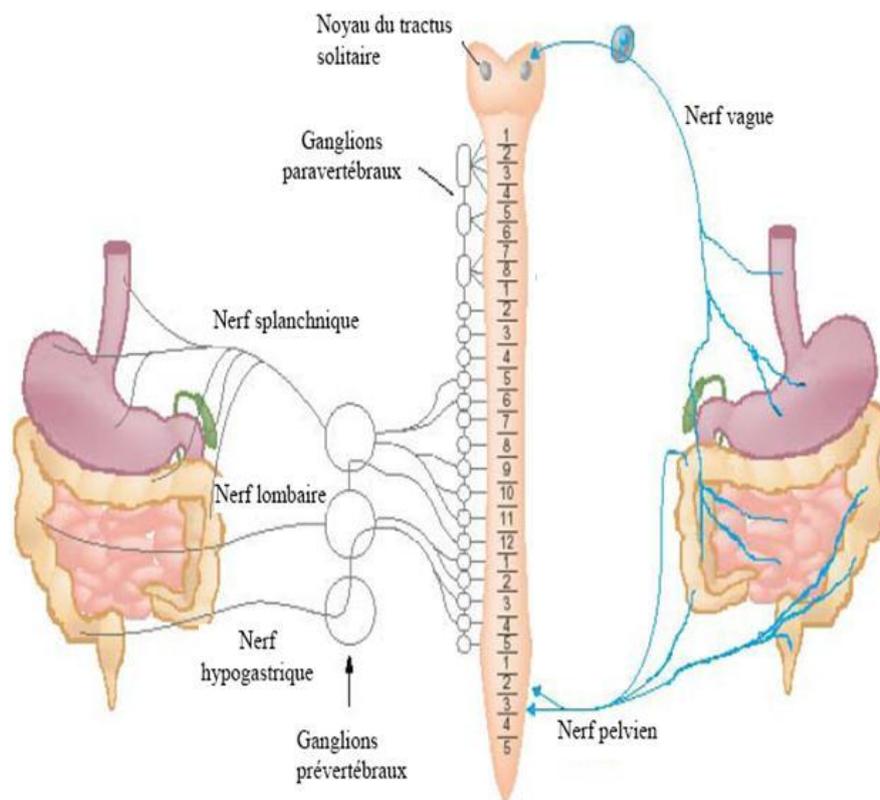


Figure 2. Les différentes efférences du système nerveux autonome (Blackshaw et Gebhart, 2002).

2.3.1. Les neurones afférents primaires intrinsèques (NAPI)

Les NAPI sont des neurones sensoriels avec leur corps cellulaires situés entre les plexus du tractus gastro-intestinal. Ils innervent les couches musculaires et la muqueuse (Shahbazian, 2002). Les NAPI sont des transducteurs des stimuli physiologiques, comme le mouvement des villosités ou la déformation de la muqueuse, la contraction du muscle intestinal et le changement dans la chimie du contenu digestif. Les NAPI sont les premiers neurones dans les réflexes

intrinsèques qui influencent la motilité, la sécrétion de la muqueuse et le débit sanguin dans l'intestin (Furness et al., 2004).

2.3.2. Les neurones efférents

Les neurones efférents contrôlent l'activité de contraction et de relaxation des muscles lisses, la vasodilatation et le transport de l'eau et des électrolytes. Les neurones moteurs sont généralement divisés en cinq types et plusieurs sous-types. Ces cinq types sont les neurones excitateurs, les neurones inhibiteurs, les neurones sécréto-moteurs vasodilatateurs, les neurones sécréto-moteurs non vasodilatateurs et les neurones qui innervent les cellules endocrines (Fig. 3) (Furness et al., 2004).

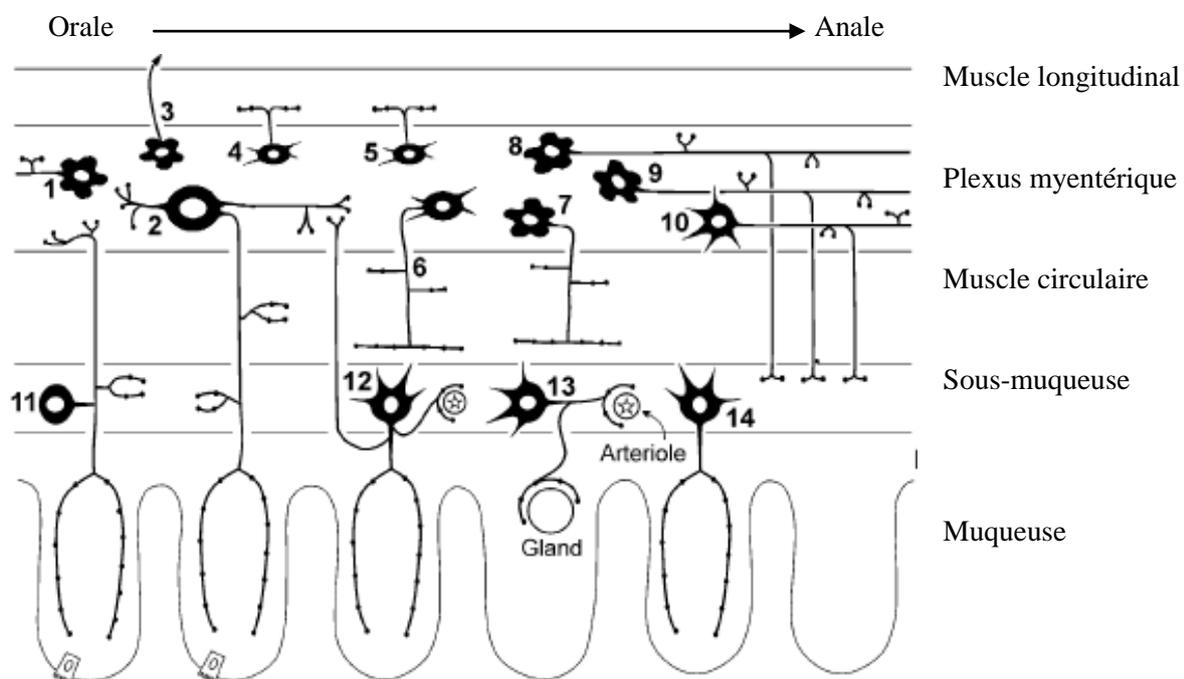


Figure 3. Les différents neurones et leur fonction dans l'intestin grêle du cobaye.

1- neurone sensoriel sous-muqueux, 2- neurone sensoriel myentérique, 3- neurone sécréto-moteur/vasodilatateur non-cholinergique, 4- motoneurone excitateur du muscle circulaire, 5- motoneurone inhibiteur du muscle circulaire, 6- neurone sécréto-moteur/vasodilatateur cholinergique, 7- interneurone descendant (réflexe sécréto-moteur), 8- interneurone descendant (réflexe de motilité) et 9- neurone sécréto-moteur/non-vasodilatateur (Furness et al., 2004).

Les motoneurones du muscle longitudinal sont cholinergiques et excitateurs. Les motoneurones excitateurs du muscle circulaire utilisent l'ACh (acétylcholine) comme transmetteur primaire et les tachykinines comme des co-transmetteurs qui peuvent agir directement sur le muscle lisse (Furness et Sanger, 2002).

Les motoneurones du muscle circulaire du côlon utilisent NO (Nitric oxide) comme neurotransmetteur inhibiteur majeur. Cependant, dans l'iléon comme dans le côlon, il existe des substances qui jouent le rôle de co-transmetteurs, comme le VIP (Vasoactif intestinal peptide), ATP (Adénosine triphosphate) et le PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)

qui agissent directement sur les muscles lisses ou indirectement par l'intermédiaire des cellules interstitielles (Alberti et al., 2005; Costa et al., 1996).

Les neurones sécréto-moteurs sont subdivisés en neurones cholinergiques et neurones non cholinergiques. Dans l'intestin grêle et le côlon du cobaye, les neurones sécréto-moteurs cholinergiques sont subdivisés en deux types, ceux qui contiennent le neuropeptide Y (et d'autres neuropeptides), et ceux qui contiennent la calrétinine. Les neurones sécréto-moteurs utilisent le VIP et le GRP (gastrin releasing peptide) comme transmetteurs primaires (Furness et Sanger, 2002).

2.3.3. Les interneurones

Les interneurones sont classés en deux types, des interneurones ascendants qui ont une direction orale, et des interneurones descendants qui ont une direction anale. Les interneurones ascendants sont cholinergiques et représentent le trajet ascendant qui constitue le réflexe propulsif de l'intestin grêle (Kunze et al., 1999). Dans le côlon, ces interneurones contiennent le VIP, la sérotonine (5-HT), la somatostatine (SOM), les tachykinines et les enképhalines. Les interneurones descendants contiennent le VIP, GRP, le NO, la calbindine, la 5-HT et la calrétinine (Lomax et Furness, 2000). Dans l'intestin grêle du cobaye, trois types d'interneurones descendants ont été identifiés avec les codages neurochimiques suivants: AChT/NOS/VIP, AChT/SOM et AChT/5-HT (AChT = Acetylcholine transferase, NOS = nitric oxide synthase) (Furness et al., 2004). Les études réalisées sur ces trois types d'interneurones ont montré que le premier type est impliqué dans les réflexes locaux de la motilité, le second type est impliqué dans la conduction des complexes myoélectriques migrants dans l'intestin grêle, le dernier type est impliqué dans les réflexes sécréto-moteurs (Furness et Sanger, 2002).

3. Les cellules interstitielles de Cajal

Généralement, le potentiel membranaire des cellules musculaires lisses du tube digestif présente des dépolarisations cycliques rythmiques, appelées ondes lentes, qui provoquent des contractions cycliques des muscles lisses. L'origine de ces ondes lentes sont les ICCs (Interstitial Cajal cells) (Dickens et al., 1999).

Les ICCs sont des cellules mésenchymateuses, interposées entre le système nerveux entérique et les cellules musculaires lisses avec de petits corps cellulaires et plusieurs prolongations allongées. Les ICCs développent de nombreuses ramifications interconnectées pour former un réseau et communiquent entre elles et avec les cellules musculaires lisses par des jonctions communicantes (Kobilo et al., 2003).

Les ICCs sont considérées comme des cellules pacemakers et peuvent être impliquées dans la neurotransmission dans les tissus périphériques, la génération et la propagation des ondes lentes (Wang et al., 2003). Les ICCs pacemakers génèrent des ondes lentes électriques, une dépolarisation régulière caractérisée par une augmentation rapide du potentiel avec une longue durée du plateau suivie par une repolarisation; les ondes lentes sont passivement transmises aux cellules musculaires lisses (Dickens et al., 1999). Les courants entrants rythmiques spontanés dans les ICCs, qui sont à la base de l'activité pacemaker de l'intestin, sont liés aux oscillations du Ca^{2+} (Torihashi et al., 2002). L'activité pacemaker des ICCs dépend de l'entrée du calcium via les canaux calciques de type L et de sa libération des réserves intracellulaires (Boddy et Daniel, 2005).

4. La motilité intestinale

La motilité gastro-intestinale inclut deux activités contractiles locales, la contraction tonique qui assure le mélange des aliments, et le péristaltisme qui induit la propulsion des aliments le long du tube digestif (Hasler, 2006). Ce type de motilité est assuré par la contraction du muscle lisse circulaire qui induit la segmentation de l'intestin et mélange les aliments, alors que la contraction du muscle longitudinale augmente le diamètre de l'intestin pour faciliter le mouvement du bol alimentaire (Hasler, 2006). La segmentation est le mouvement le plus important dans l'intestin grêle, il consiste en plusieurs types de mouvements qui apparaissent comme une série de contractions séparées par une phase de silence de l'activité contractile; ces types de contractions sont des contractions stationnaires et des contractions se propageant sur de petites distances (Gwynne et al., 2004).

Dans la phase des contractions stationnaires, les contractions spontanées générées sont phasiques et rythmiques et chaque contraction est associée à une seule onde lente (Sarna, 1998). L'amplitude des contractions spontanées de l'iléon et du jéjunum de lapin est presque le double de celle notée dans le duodénum (Grasa et al., 2005); mais la fréquence et le tonus des contractions phasiques des trois régions de l'intestin ne sont pas différentes (Lamarca et al., 2006). Dans le cas de la souris, la fréquence des contractions phasiques du muscle longitudinale du jéjunum est plus grande que celle de l'iléon (Ueno et al., 2004a). Chez le lapin, le muscle longitudinal de l'intestin se contracte avec une amplitude et un tonus plus élevés que ceux notés dans le muscle circulaire (Grasa et al., 2004).

Le blocage des récepteurs muscariniques et adrénergiques du muscle longitudinal ou circulaire de l'iléon, du jéjunum et du duodénum du lapin par l'atropine et la guanéthidine diminue l'amplitude et le tonus des contractions phasiques; alors que la fréquence reste

inchangée dans le cas du muscle longitudinal et elle diminue dans les préparations circulaires (Lamarca et al., 2006), indiquant que les antagonistes cholinergiques et adrénrgiques induisent des effets différents sur les caractéristiques de la contraction spontanée selon le type de muscle (Grasa et al., 2004). La diminution de l'amplitude et du tonus des contraction est aussi observée lors du blocage des récepteurs muscariniques des segments du duodénum de la souris avec l'atropine (Mulè et al., 1999c). Le blocage de la transmission nerveuse par la tétrotoxine diminue l'amplitude et le tonus des contractions du muscle longitudinal et augmente le tonus dans le cas du muscle circulaire de l'intestin; alors que la fréquence reste inchangée dans le cas des deux préparations (Grasa et al., 2004). Dans une autre étude, l'addition de la tétrotoxine (TTX) ou de l'atropine aux segments du jéjunum de lapin n'a aucun effet sur les contractions phasiques (Satoh et al., 1990). Contrairement au lapin, la TTX augmente l'amplitude des contractions du muscle circulaire du duodénum de la souris (Mulè et al., 1999c). Après le traitement du muscle longitudinal du jéjunum de lapin avec la TTX, les contractions phasiques résiduelles sont légèrement inhibées par l'atropine, le même effet est observé si l'ordre des traitements est inversé (Romanelli et al., 2003). Le blocage des récepteurs nicotiques ganglionnaires par l'hexaméthonium n'a aucun effet sur les contractions phasiques du muscle longitudinal de l'iléon de la souris (Baldassano et al., 2008). Le blocage des neurones cholinergiques et adrénrgiques par le blocage des récepteurs, le blocage des neurones nitrgiques par l'inhibition de la production du NO ou de la guanyl cyclase et l'inhibition totale de la transmission nerveuse par le blocage des canaux sodiques montrent que la régulation tonique du muscle longitudinal n'est pas contrôlée par les neurones entériques (Ueno et al., 2004b). L'application de l'hexaméthonium, l'atropine ou la TTX aux préparations circulaires du côlon ne modifie ni la fréquence ni l'amplitude des contractions phasiques, ni même le tonus basal, suggérant que cette activité cyclique régulière est d'origine myogène (Benabdallah et al., 2008).

Le péristaltisme propulse le chyme le long du tube digestif, il apparaît aussi dans l'intestin contenant ou non le chyme, il dépend de la contraction et du tonus du muscle lisse pour assurer sa maintenance et sa propagation (Spencer et al., 2001a). Pour assurer ces deux modèles de contractions (segmentation et péristaltisme), les deux types de muscles lisses ne doivent pas se contracter en même temps; il à été démontré que lorsque le muscle lisse longitudinal se contracte, le muscle lisse circulaire est relâché et inversement (Grider, 2003).

Parallèlement, lorsque les muscles lisses circulaires et longitudinaux se contractent dans la partie orale, il y a une relaxation de ces muscles du côté anal, ce qui assure la propulsion des aliments (Smith et Robertson, 1998). Le péristaltisme et la segmentation sont contrôlés par le système nerveux puisque le blocage de ce dernier par la TTX inhibe ces deux types de contraction (Gwynne et al., 2004). En effet, le péristaltisme résulte de l'activation des réflexes ascendants excitateurs, détectés dans la couche musculaire en amont du stimulus, et des réflexes descendants inhibiteurs, détectés en aval du stimulus (Spencer et Smith, 2001a). Dans la voie excitatrice, la transmission neuro-neuronale ascendante et descendante est complexe et utilise des neurotransmetteurs autres que l'acétylcholine.

A l'état de jeûne, il y a des contractions spontanées qui se produisent et se propagent dans la direction anale, elles sont appelées MMC (Migrating motor complex); ces contractions sont présentes dans l'iléon (IMMC) comme dans le côlon (CMMC) avec un intervalle entre les contractions plus grand dans les IMMC que dans les CMMC (Bush et al., 2000). Les MMC sont divisées en trois phases. La phase I est une phase de silence, elle constitue 40 à 60% du cycle de la contraction, elle est suivie par la phase II qui est caractérisée par des contractions simples et irrégulières (20 à 30% du cycle de contraction) et ensuite par la phase III qui est caractérisée par des contractions rythmiques pendant une durée de cinq à dix minutes (Hasler, 2006). Les MMC peuvent se produire spontanément ou induites par les ondes lentes des ICCs (Huizinga et Lammers, 2009). De même, les MMC peuvent être générées par l'augmentation de la pression des fluides; la période de silence entre les MMC est contrôlée par la libération tonique du monoxyde d'azote (Powell et al., 2003).

5. La contraction musculaire

Le muscle lisse du tube digestif présente un tonus qui est imposé par des contractions rythmiques induites par des ondes lentes qui sont accompagnées par l'augmentation de l'influx du calcium dans les cellules musculaires (Hashitani et al., 2001). L'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire peut résulter de l'entrée du calcium extracellulaire et de sa libération des réserves intracellulaires (Wray et al., 2005).

Le calcium entre dans la cellule via les canaux calciques de type L et les canaux calciques sensibles à la dihydropyridine, ces canaux sont activés par la dépolarisation de la membrane plasmique (Fig. 4). D'autres mécanismes d'entrée du calcium incluent les canaux cationiques non sélectifs activés par les agonistes des récepteurs muscariniques et l'entrée capacitative du calcium (Fig. 4) (Sanders, 2001; So et Kim, 2003). Le Ca^{2+} intracellulaire va à son tour entraîner la libération massive du calcium des réserves par l'activation des récepteur de la ryanodine (Fig. 4) (Ma et al., 2003; Sanders, 2001).

L'augmentation de la concentration du calcium peut être stimulée par le couplage pharmacomécanique qui induit la libération du Ca^{2+} intracellulaire, ce processus implique des récepteurs qui activent la phospholipase C ($\text{PLC}\beta$) (Fig. 4). L'activation de cette dernière libère l'inositol triphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (Makhlouf et Murthy, 2006). L' IP_3 libéré va à son tour libérer le calcium des réserves sarcoplasmiques en activant les canaux/récepteurs de l' IP_3 (McCarron et al., 2002).

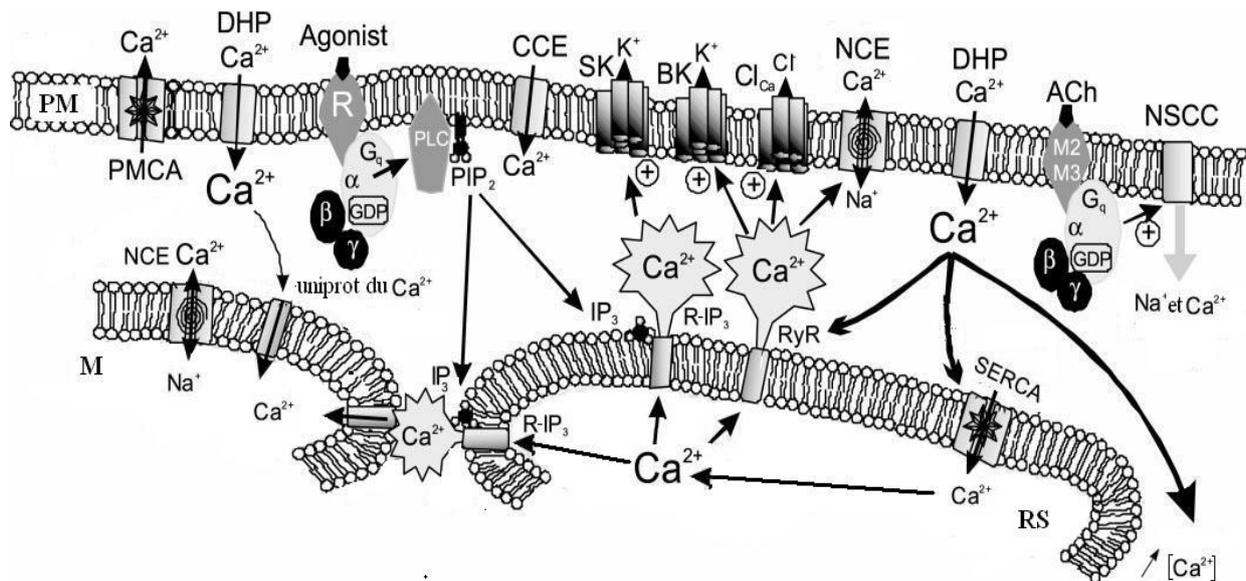


Figure 4. Principales voies d'entrée et de libération du calcium.

ACh: acetylcholine, BK: large conductance calcium activated K^+ channels, CCE: capacitive calcium entry, Cl_{Ca} : calcium activated Cl^- channels, DHP: dihydropyridine, IP_3 : inositol triphosphate, M: mitochondria, M2/M3: muscarinic receptor, PM: plasma membrane, NCE: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange, NSCC: non selectif cationic channel, PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-diphosphate, PLC: phospholipase C, PMCA: plasma membrane calcium pump, R: receptor, R- IP_3 : IP_3 receptor, RS: sarcoplasmic reticulum, RyR: ryanodine receptor, SERCA: Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SK: small conductance calcium activated K^+ channels (D'après Sanders, 2001).

Les canaux potassiques et les canaux chloriques jouent un rôle important dans la régulation de l'excitabilité de la cellule musculaire. Ces canaux sont activés par l'augmentation du calcium intracellulaire. L'activation des canaux à chlore induit la sortie du Cl^- , et par conséquent la dépolarisation de la membrane. Par contre, l'activation des canaux potassiques sensibles au calcium entraîne une sortie du K^+ et hyperpolarise la membrane (Sanders, 2001). L'hyperpolarisation des muscles est accompagnée par la réduction de l'entrée du Ca^{2+} et par la relaxation des muscles lisses (Sanders, 2008). Il ya au moins trois familles de canaux potassiques activés par le calcium: les BK (large conductance calcium activated K^+ channels), les SK (small conductance calcium activated K^+ channels) et les IK (intermédiaire conductance K^+ channels);

le classement des ces canaux est basé sur des différences dans leurs propriétés physiologiques et pharmacologiques (Shieh et al., 2000).

Les canaux BK sont activés par l'acide niflumique et inhibés par le tetraethylammonium (TEA), l'ibériotoxine, la charybdotoxine et la paxilline. Cependant, les canaux SK sont insensible au TEA et inhibés par l'apamine et le déqualinium (Castle, 1999). Les canaux IK sont des canaux indépendants du voltage et insensibles au TEA, ils sont activés par le chlorzoxazone et la zoxazolamine et inhibés par la charybdotoxine et le clotrimazole (Shieh et al., 2000).

Les canaux Kv (Voltage-dépendant K^+ channels) et les canaux K^+ sensibles à l'ATP contribuent aussi au contrôle de l'excitabilité et la contraction musculaires (Imai et al., 2001). Le blocage de ces canaux induit la dépolarisation de la membrane et la contraction du muscle lisse, cette dernière résulte de l'entrée du calcium par les canaux calciques voltage-dépendants (Dong et al., 2005).

5.1. Les neurotransmetteurs du muscle lisse intestinal

L'acétylcholine est le neurotransmetteur majeur du système nerveux entérique de l'intestin (Lecci et al., 2002). L'activation des récepteurs de l'ACh, localisés au niveau des motoneurones excitateurs, permet la libération du neurotransmetteur au niveau de la fente synaptique pour induire la contraction du muscle lisse. L'ACh libérée réagit avec ses récepteurs spécifiques localisés sur la cellule musculaire ou est hydrolysé dans la fente synaptique par l'action de l'acétylcholinestérase. L'inhibition de l'acétylcholinestérase par des inhibiteurs spécifiques (néostigmine) provoque l'accumulation de l'ACh dans les jonctions neuromusculaires pour stimuler la contraction (Baldassano et al., 2008; Benabdallah et al., 2008).

Dans le tube digestif, l'acétylcholine agit principalement via les récepteurs muscariniques M2 et M3 pour induire la contraction du muscle lisse (Ehlert, 2003). Dans les muscles lisses de l'iléon, du côlon, de l'estomac et de la vessie, la densité des récepteurs muscariniques de type M2 est trois fois supérieure à celle du type M3 dans la plupart des espèces, incluant l'homme. Cependant, la contraction directe de l'intestin et de la vessie fait intervenir principalement les récepteurs M3 (Uchiyama et Chess-Williams, 2004). Les récepteurs M3 sont couplés à la protéine G_q (Yousufzai et al., 2000); alors que les récepteurs M2 sont couplés à G_i (Sales et al., 1997). De plus, l'activation de ces récepteurs induit l'ouverture des canaux cationiques non sélectifs et les canaux calciques de type L (Jin et al., 2002). L'activation des récepteurs muscariniques par l'ACh ou un agoniste (carbachol) induit la contraction du muscle lisse, une réponse qui résulte de l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (McCarron et al., 2002).

En plus de l'acétylcholine, l'ATP semble jouer un rôle important dans la transmission neuro-neuronale excitatrice au niveau du muscle longitudinal et circulaire en agissant sur les récepteurs P2X et P2Y (Spencer et al., 2000b). L'activation des récepteurs P2Y induit la libération de l'ACh des neurones excitateurs (Sawyer et al., 2000). Dans les cellules musculaires lisses du côlon du cobaye, la contraction induite par l'ATP est réduite par l'inhibition de la phospholipase C et elle est abolie par la déplétion des réserves internes du Ca^{2+} , indiquant la participation des récepteurs P2Y de l'ATP dans cette réponse (Zizzo et al., 2008).

Bien que l'ATP soit impliquée dans la neurotransmission excitatrice, elle est aussi un neurotransmetteur inhibiteur NANC (non adrénérgic non cholinérgic) de la contraction du muscle lisse de l'iléon de l'homme et du rat, par activation des récepteurs purinergiques P_2 (Benko et al., 2006). Dans le muscle lisse de l'iléon et du jéjunum du cobaye, l'ATP induit la relaxation en activant le potentiel de jonction inhibiteur et en diminuant le Ca^{2+} intracellulaire nécessaire à la contraction (Wang et al., 2007). De plus, l'ATP induit une hyperpolarisation de la membrane par activation des canaux K^+ sensibles à l'ATP (Lorenz et al., 1992).

Les tachykinines constituent une famille de neuropeptides qui regroupe la substance P, la neurokinine A et la neurokinine B (Lecci et al., 2002). Les tachykinines jouent un rôle important dans le contrôle de la motilité gastro-intestinale, la sécrétion, la transmission nerveuse et la sensibilité à la douleur. Les récepteurs des tachykinines sont présents dans les neurones entériques, les ICCs, l'épithélium, le muscle lisse du tube digestif et la vessie (Holzer et Holzer-Petsche, 2001).

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est stockée et libérée par les cellules entérochromaffines et les neurones entériques cholinérgiques (Lomax et Furness, 2000), elle participe dans la transmission excitatrice à travers les récepteurs 5-HT₃ localisés sur les neurones cholinérgiques (Furness et Sanger, 2002). Les récepteurs de la 5-HT sont détectés dans diverses régions du tractus intestinal du rat et de la souris y compris le jéjunum, l'iléon et le côlon (Chetty et al., 2006).

Le NO est considéré comme étant le principal neurotransmetteur inhibiteur (Benko et al., 2005). Dans le tube digestif, trois types de NOS (nitric oxid synthase) sont identifiés, la nNOS (neural NOS), la eNOS (endothelial NOS) et la iNOS (induced NOS) (Teng et al., 1998). Le NO est produit dans les neurones entériques à partir de la L-arginine par la nNOS (Xue et al., 2000). L'inhibition de la NOS par le L-NAME (N-méthyl-L-arginine ester) augmente la fréquence et l'amplitude des contractions du muscle circulaire du côlon du rat (Mulè et al., 1999a). Dans les cellules musculaires lisses, le NO ou le SNP (sodium nitroprussiate), un donneur de NO, induisent l'hyperpolarisation de la membrane et relâchent le muscle lisse en activant la guanyl cyclase, cet effet est inhibé par le L-NNA, un inhibiteur de la NOS, et par le

ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one), un inhibiteur de la guanyl cyclase (Ueno et al., 2004b). Dans le muscle longitudinal de l'iléon du cobaye, le SNP hyperpolarise la membrane par l'activation des canaux potassiques sensibles à l'apamine (Goyal et He, 1998). La libération endogène du NO inhibe la transmission cholinergique par inhibition de la libération de l'ACh par les neurones cholinergiques (Kilbinger et al., 2002). Par contre, le NO augmente la libération de l'ACh dans le fundus du cobaye; mais réduit la réponse du muscle lisse à l'ACh (Sotirov et al., 1999). Il semble que c'est la nNOS et non la eNOS qui soit responsable de l'inhibition de la libération de l'ACh par le NO (Mang et al., 2002).

Le VIP et son homologue, le PACAP, sont des neurotransmetteurs inhibiteurs libérés à partir des fibres NANC. Ces neuropeptides induisent la relaxation du muscle gastro-intestinal en agissant sur le même type de récepteurs (Parkman et al., 1997). La relaxation induite par le VIP et le PACAP est le résultat de l'hyperpolarisation de la membrane (Pluja et al., 2000). Dans le cas du PACAP, l'hyperpolarisation membranaire est due à l'ouverture des canaux K^+ sensibles au calcium induite par l'activation des tyrosines kinases (Takeuchi et al., 1999). Dans le muscle longitudinal et circulaire de l'intestin grêle de la souris, l'application du VIP en présence de l'ODQ diminue la relaxation induite par le VIP, suggérant que le VIP augmente la concentration du GMPc pour induire la relaxation du muscle lisse (El-Yazbi et al., 2007). Il a été démontré que la libération du VIP et du PACAP active la eNOS et augmente la concentration du GMPc (Lecci et al., 2002). De plus, le VIP augmente le taux de d'AMPc, conduisant à l'activation des canaux potassiques et à la relaxation muscle lisse du côlon (Kishi et al., 2000).

Dans le système nerveux entérique, le monoxyde de carbone (CO), produit par l'hème oxygénase type 2 (Xue et al., 2000), induit la relaxation du muscle lisse de l'estomac en augmentant la conductance des canaux K^+ , un effet qui revient à l'activation de la PKG par le GMPc et à la diminution de la libération du calcium des réserves intracellulaires (Kadinov et al., 2002). L'augmentation du taux de GMPc par le CO est également notée dans le jéjunum de la souris (Xue et al., 2000).

5.2. La signalisation intracellulaire de la contraction

La contraction musculaire est réalisée par le glissement des filaments d'actine et de myosine les uns par rapport aux autres, ce mouvement nécessite du Ca^{2+} et de l'ATP.

Les muscles se différencient les uns des autres par leur type de contraction. Les structures élastiques permettent des contractions des fibres musculaires qui ne conduisent pas obligatoirement à un raccourcissement correspondant du muscle dans son ensemble. Lorsque de tels raccourcissements apparaissent, on parle de contraction isotonique. L'étirement des éléments élastiques est à l'origine d'un raccourcissement musculaire qui est cependant le plus souvent

inférieur au raccourcissement des fibres musculaires. Dans le cas extrême la longueur du muscle n'est pas du tout modifiée; seule la tension augmente, on parle de contraction isométrique. Pour évaluer la force de contraction développée par les éléments moteurs soit la charge est soulevée (contraction isotonique), soit les éléments élastiques sont étirés, c'est à dire la tension est augmentée (contraction isométrique) (Wehner et Gehring, 1999).

L'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} conduit à la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC_{20}) qui constitue le stimulus primaire de la contraction (Fig. 5) (Murthy, 2006). L'interaction entre l'actine et la myosine génère la force contractile du muscle (Makhlouf et Murthy, 2006).

La durée de la phosphorylation de la MLC_{20} reflète un équilibre entre l'activité de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) et celle de la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) qui phosphoryle et déphosphoryle respectivement la MLC_{20} (Fig. 5) (Sanders, 2008). La phosphorylation de la MLC pendant la contraction phasique induite par les agonistes fait intervenir la MLCK dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline; alors que la phosphorylation de la MLC_{20} pendant la contraction tonique met en œuvre la MLCK indépendante du Ca^{2+} et l'inhibition de la MLCP (Makhlouf et Murthy, 2006).

Les récepteurs qui initient la phosphorylation de la MLC_{20} sont des récepteurs couplés à la protéine G ($\text{q}_{11}, \alpha_{12/13}$) (Sanders, 2008). L'activation d'un récepteur couplé à la protéine G par un agoniste contractile, tels que l'ACh, le carbachol ou la motiline, initie plusieurs voies de signalisation qui induisent la dépolarisation membranaire et l'augmentation de l'influx du Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et les canaux cationiques non sélectifs, activent la MLCK et inhibent la MLCP via la protéine kinase C (PKC) (Fig. 5, Fig. 6), la Rho kinase et la libération de l'acide arachidonique (Sarna, 2006). L'acide arachidonique peut subir des transformations pour former les prostaglandines et les leucotriènes qui induisent la contraction en se fixant sur des récepteurs couplés à la protéine G (Harnett et al., 2005).

La PKC, activée par le DAG, induit la contraction en phosphorylant la MLC_{20} via l'activation de la CPI-17 (Fig. 5), un inhibiteur de la MLCP (Huang et al., 2005; Murthy, 2006). La PKC peut aussi moduler l'activité des canaux ioniques, incluant les canaux potassiques activés par l'ATP et les canaux potassiques activés par le calcium (Barlow et al., 2000).

Les petites protéines G (RhoA et Ras) contribuent également dans la contraction musculaire en induisant la phosphorylation de la MLC_{20} (Fig. 5), cela résulte de l'activation de la Rho-kinase et de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Quinn et al., 2006). Le maintien de la contraction et la phosphorylation de la MLC_{20} est initiée par l'activation des récepteurs couplés à la protéine $\text{G}_{q12/13}$ qui active RhoGEF (Rho-specific guanine nucleotide exchange factor) (Murthy, 2006). La translocation de RhoA activée initie deux voies de signalisation impliquant la

Rho-kinase et la PKC (Murthy, 2006). La Rho-kinase phosphoryle la sous-unité régulatrice MYPT1 en induisant sa dissociation de la sous-unité catalytique PP1c et son inhibition, ce qui conduit à la phosphorylation de la MLC₂₀ et la contraction du muscle lisse (Huang et al., 2005).

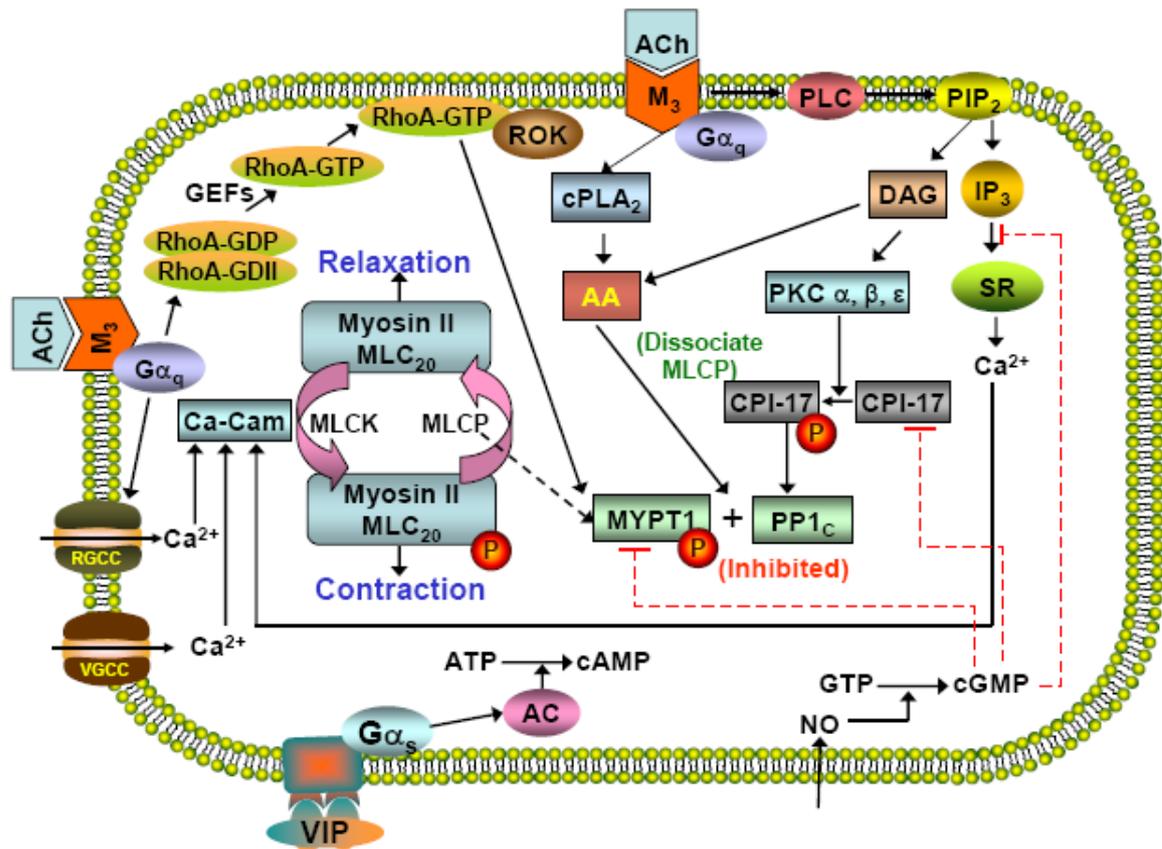


Figure 5. Les voies de la génération de la contraction dans les cellules du muscle lisse circulaire (Sarna, 2006). AA: arachidonic acid; CaM: calmoduline; CPI-17 : MLCP endogène inhibiteur 17 kDa; cPLA₂: cytosolic phospholipase A₂; DAG: diacylglycerol; GEFs: guanylexchange factor; MYPT1: MLCP target subunit; PIP₂; phosphatidyl inositol 4,5,-biphosphate; PP1c: Proteine phosphatase type 1 catalytic subunit ; RGCC: receptor gated calcium channels; RhoA-GDI: la guanine dissociation inhibitor; SR: sarcoplasmic reticulum; VGCC: voltage gated calcium channels.

L'activation de la protéine G_s active l'adényl cyclase, l'élévation du taux d'AMPc résultant active la PKA. Le NO diffuse dans la cellule pour activer la guanyl cyclase soluble (Fig. 5), ce qui augmente la concentration du GMPc et l'activation de la PKG (Makhlouf et Murthy, 2006). La PKA induit l'hyperpolarisation de la membrane en activant des canaux potassiques (Kishi et al., 2000). La PKG inhibe la libération du Ca²⁺ intracellulaire et stimule sa séquestration respectivement par la phosphorylation des récepteurs de l'IP₃ et de la SERCA (Fig. 6) (Murthy, 2006).

La PKA et la PKG inhibent les canaux calciques, activent la protéine RGS (regulator of G protein signalling) qui inhibe les récepteurs G_{α_q} conduisant à l'inactivation de la PLC- β et l'inhibition de la libération du calcium par l' IP_3 . De même, la PKA et la PKG inhibent directement la RhoA et bloquent la phosphorylation de la MYPT1 par la Rho-kinase, conduisant à l'augmentation de l'activité de la MLCP qui déphosphoryle la MLC_{20} et relâche le muscle lisse (Fig. 6) (Makhlouf et Murthy, 2006; Murthy, 2006).

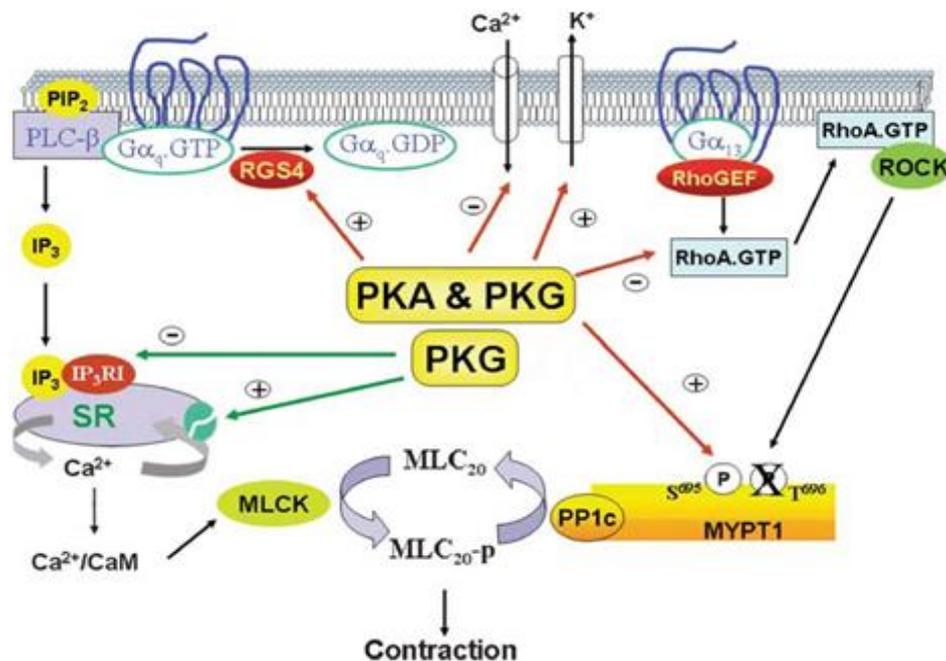


Figure 6. Les cibles moléculaires de la PKA et la PKG pendant la relaxation du muscle lisse (Murthy, 2006).

MLC: myosine light chain; CaM: calmoduline; cPLC β : phospholipase C β ; GEFs: guanyl exchange factor; MYPT1: MLCP target subunit; PP1c: Proteine phosphatase type 1 catalytic subunit; ROCK: Rho-kinase; SR: sarcoplasmic reticulum; RGS : regulator of G protein signaling; PIP $_2$: phosphatidyl inositol 4,5,-diphosphate; IP $_3$: phosphatidyl inositol 1,4,5,-triphosphate.

6. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont définis comme étant des molécules qui portent un électron non apparié (célibataire) sur leur orbite externe, ils sont généralement très réactifs et instables. Des exemples peuvent être données sur les radicaux oxygénés comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le radical alkoxy (RO^{\cdot}) et le radical hydroperoxy (HO_2^{\cdot}). D'autres espèces radicalaires dérivent de l'azote comme le monoxyde d'azote NO^{\cdot} et le dioxyde d'azote ($^{\cdot}NO_2$). Les radicaux libres de l'oxygène et de l'azote peuvent être convertis en espèces réactives

non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux ($HOCl$), l'acide hypobromeux ($HOBr$) et le peroxyde d'azote ($ONOO^-$). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) incluent les espèces radicalaires et non radicalaires et qui sont produites dans les organismes vivant dans des conditions physiologiques et pathologiques (Asmus et Bonifacic, 2000).

6.1. Rôles physiologiques des radicaux libres

Les radicaux libres jouent un rôle important dans les fonctions physiologiques des organismes, comme la régulation du tonus des vaisseaux, la régulation des fonctions qui sont contrôlées par la concentration de l'oxygène et l'activation du signal de transduction à partir d'une variété des récepteurs membranaires, incluant les récepteurs des antigènes des lymphocytes (Droge, 2002). De plus, il a été démontré que l'anion superoxyde et ses dérivés (le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle) induisent l'activation de la guanyl cyclase et augmentent la production de l'interleukine-2 (Droge, 2002). Le NO produit par les cellules endothéliales est essentiel dans la régulation de la contraction et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, l'adhésion des leucocytes et l'agrégation des plaquettes (Ignarro et al., 1999). De plus, le NO produit par les neurones sert comme un neurotransmetteur, alors que le NO généré par les macrophages activés est un médiateur important dans la réponse immunitaire (Fang et al., 2002). L'effet cytotoxique des radicaux libres est responsable de la destruction des agents pathogènes par les macrophages et les autres cellules phagocytaires dans le système immunitaire (McCord, 2000).

6.2. La formation des radicaux libres

Dans les conditions physiologiques, les mitochondries constituent la principale source de production des ROS. Au cours de la respiration cellulaire, l'oxygène est transformé en anion $O_2^{\cdot-}$ au cours de l'oxydation du $NADH-H^+$, du NADPH et du $FADH_2$ dans la chaîne de transport des électrons (Metzeler, 2003). De même, l'oxygène peut se transformer en H_2O_2 et en $O_2^{\cdot-}$ par l'action du cytochrome P450 ou les radiations ionisantes (Fang et al., 2002). Durant l'ischémie, la production des radicaux, surtout l'anion superoxyde, est importante à la reperfusion suite à l'oxydation de la xanthine ou de l'hypoxanthine par la xanthine oxydase (Bergamini et al., 2004; Itoh et al., 1999). Le NO^{\cdot} et le $O_2^{\cdot-}$ sont formés respectivement à partir de la l'arginine et l'oxygène par l'action de la NO synthase (Pou et al., 1992). Le $O_2^{\cdot-}$ est transformé en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). Le peroxyde d'hydrogène est aussi formé dans les peroxysomes des macrophages (Bergamini et al., 2004). Le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) provient de la réaction du

peroxyde d'hydrogène avec l'anion superoxyde (réaction d'Haber Weiss) ou avec l'ion ferreux (réaction de Fenton) (Comhair et Erzurum, 2002). Le radical hydroxyle est aussi produit par l'action des rayons ionisants sur l'oxygène en présence de l'eau (Kohen et Nyska, 2002). Le peroxyde d'azote (ONOO⁻), très réactif, est issu de la réaction très rapide du monoxyde d'azote avec l'anion superoxyde (Fridovich, 1999); il peut même se former à partir du peroxyde d'hydrogène et du monoxyde d'azote (Fang et al., 2002). L'acide hypochloreux (HOCl) est le produit de la réaction du peroxyde d'hydrogène et de l'ion chlorure dans une réaction catalysée par la myéloperoxydase (Martinez-Cayuela, 1995). Les autres radicaux, alkyle (R[•]), alkoxy (RO[•]) et alkoperoxy (ROO[•]), sont issus de la réaction de l'anion superoxyde ou de l'hydroxyle sur les chaînes d'acide gras, les protéines et les glucides (Fang et al., 2002).

6.3. Les systèmes antioxydants

Il existe plusieurs systèmes de défense contre les radicaux libres incluant, les antioxydants endogènes, qui se divisent en antioxydants enzymatiques comme la SOD, la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) et les antioxydants non enzymatiques, incluant le glutathion (GSH), l'acide urique, la mélatonine, la ferritine. Les antioxydants exogènes proviennent généralement des aliments et incluent les vitamines A, C et E, les caroténoïdes, les composés phénoliques et quelques métaux, comme le sélénium et le zinc (Bhardwaj, 2008).

6.3.1. Le système antioxydant enzymatique

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme antioxydante qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en O₂ et d'autres espèces non réactives comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) selon la réaction suivante: (2O₂^{•-} + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂) (Bergamini et al., 2004). L'action de la SOD est suivie par l'intervention de la catalase, c'est une enzyme présente dans les peroxysomes des cellules, elle est responsable de la conversion de l'hydrogène peroxyde en eau et oxygène organique selon la réaction suivante (2H₂O₂ → 2H₂O + O₂) (Mates et al., 1999).

Toutes les GPx, en conjugaison avec le glutathion, ajoutent deux électrons pour réduire le peroxyde (substrats de la réaction de Fenton) et former les sélénoles (Se-OH). Les GPx, en oxydant simultanément le glutathion, décomposent l'hydrogène peroxyde ou le peroxyde organique en eau ou en alcool (Comhair et Erzurum, 2002).



Les peroxyrédoxines (Prx) exercent leur activité antioxydante par leur activité peroxydase (ROOH + 2e⁻ → ROH + H₂O) et qui peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène, le peroxyde d'azote et surtout l'hydroperoxyde organique (Wood et al., 2003).

6.3.2. Les antioxydants non enzymatiques

L' α -tocophérol, la forme la plus active de la vitamine E, est considérée comme l'antioxydant majeur lié à la membrane cellulaire. La vitamine E stoppe la chaîne des réactions de peroxydation des lipides en capturant un radical lipoperoxy (LOO^\bullet), elle devient alors à son tour un radical, moins réactif que le LOO^\bullet , qui pourra être régénéré par la vitamine C (Comhair et Erzurum, 2002).

La vitamine C (acide ascorbique) est un puissant antioxydant; elle coopère avec la vitamine E pour générer l' α -tocophérol à partir du radical α -tocophérol dans les membranes et les lipoprotéines (Kojima, 2004).

Le glutathion (GSH), un tripeptide, est un antioxydant non enzymatique multifonctionnel et intracellulaire qui contient un groupement thiol. Ce tripeptide est très abondant dans le cytosol, le noyau et la mitochondrie avec une concentration qui peut être mesurée en mM. La forme réduite du glutathion est GSH alors que sa forme oxydée est GSSG. Le glutathion joue un rôle important dans le maintien de l'état redox des protéines, il intervient aussi dans la réaction d'élimination des radicaux libres par les enzymes anti-oxydantes, telle que la glutathion peroxydase. En général, l'activité antioxydante du glutathion est due à la présence de l'atome de soufre qui est capable de perdre un électron pour former GS^\bullet , ce dernier, par une réaction de dimérisation, va former le GSSG (Jones, 2008).



6.4. Les dommages induits par les radicaux libres

L'excès des radicaux libres et des différentes espèces réactives produits à partir des sources endogènes et exogènes peut conduire au dommage des composants cellulaires et à l'altération des fonctions cellulaires comme la division cellulaire et l'apoptose. De plus, l'effet toxique des radicaux libres peut conduire à la mort cellulaire. Les cibles biologiques des radicaux libres sont en grande partie les protéines, les lipides membranaires et l'ADN (Valko et al., 2007).

Les membranes cellulaires sont les cibles les plus attaquées par les radicaux libres à cause de la présence de grandes concentrations de lipides insaturés. Les radicaux peroxy arrachent un atome d'hydrogène d'un lipide adjacent, formant ainsi un lipoperoxyde (Bergamini et al., 2004).

Les protéines font partie des cibles attaquées par les radicaux libres, les modifications induites par les radicaux libres peuvent être: la modification des groupements thiols (SH), ces derniers sont présents dans les canaux calciques de type L, les canaux récepteurs de la dihydropyridine et les canaux potassiques (Rogers et al., 2006). La modification de l'état redox de ces groupements conduit à la déformation de la cellule, la déplétion des réserves calciques et le changement de

l'état d'ouverture des canaux potassiques et calciques (Bellomo et al., 1982).

6.5. Le stress oxydatif et la contraction musculaire

6.5.1. Effets de l'inflammation

Dans un modèle d'inflammation induite par l'acide 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique chez le rat et après 36 heures, l'activité de la myéloperoxydase est augmentée de 20 fois avec une diminution de la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon. De plus, la contraction induite par le KCl, l'ACh, la 5-HT, la PGF et la stimulation électrique est diminuée, indiquant que la diminution de la contraction résulte de l'altération de la fonction de la cellule musculaire à un niveau post-récepteur. Après une semaine, l'activité de la myéloperoxydase retourne à la normale ; cependant, la contraction spontanée et la contraction induite semblent être augmentées. Après la normalisation des mesures en fonction de la surface de la couche des muscles longitudinales, il s'avère que les contractions spontanées et induites ne sont pas différentes de celles observées chez les témoins, indiquant que l'augmentation de l'activité contractile est due au changement structurelle de la couche musculaire (Moreels et al., 2001). Dans le cas des bandelettes du muscle circulaire de l'iléon du rat, l'inflammation induite par l'indométacine diminue la contraction induite par le carbachol et la relaxation induite par la stimulation électrique. (Piepoli et al., 2005). Dans les modèles expérimentaux vivants, l'inflammation induite de l'iléon du chien par l'indométacine et l'acide acétique diminue la contraction spontanée du muscle lisse circulaire de l'iléon et inhibe la contraction induite par la méthacholine. L'infusion intra-artérielle de H-7 ou de la chelérythrine (des inhibiteurs de la protéine kinase C) inhibe la contraction induite par le méthacholine dans l'iléon normal. Cependant, l'effet de l'inhibition de la PKC sur la contraction induite par le méthacholine est absent dans le cas de l'iléon enflammé, suggérant que l'inflammation inhibe la contraction induite par les agonistes des récepteurs muscariniques via l'inhibition de la voie de la signalisation par la protéine kinase C (Sarna, 1998). Dans le même modèle expérimental, *in vivo* ou *in vitro*, l'inflammation ne modifie pas la contraction spontanée du muscle longitudinal de l'iléon ou la contraction induite par les agonistes des récepteurs muscariniques (méthacholine, muscarine); alors que ces contractions sont inhibées dans les cellules du muscle circulaire. Cette différence peut revenir à l'utilisation différentielle des récepteurs M2 et M3 par les deux types de cellules (Shi et Sarna, 1999).

6.5.2. Effets de l'ischémie et la reperfusion

Après une certaine durée d'ischémie, la reperfusion, qui favorise la formation des ROS et en particulier l'anion superoxyde (Itoh et al., 1999), diminue l'activité contractile spontanée du jéjunum de la souris et inhibe la contraction induite par la stimulation électrique. L'addition des systèmes antioxydants, comme le glutathion et la SOD, permet aux tissus de se contracter après leur stimulation électrique, indiquant que l'inhibition de la contraction résulte de l'effet des radicaux libres (Bielfeldt et Conklin, 1997).

6.5.3. Effets de l'ABAP

Dans un autre modèle de stress oxydatif, le 2,2'-azobis (2-amidinopropane) (ABAP, un générateur de radicaux peroxy), réduit, d'une manière dépendante de la concentration, la contraction spontanée du jéjunum et la contraction de l'iléon de lapin induite par l'acétylcholine. Cet effet est réversible après l'élimination de l'ABAP par le lavage. Cependant, l'addition cumulée de l'ABAP induit une inhibition irréversible de la contraction spontanée et induite des segments du jéjunum et de l'iléon du lapin. Dans le même contexte, la contraction induite par le BaCl₂ est inhibée par le traitement des segments de l'iléon par l'ABAP et restaurée après l'addition du BayK-8644, un ouvreur des canaux calciques de type L, suggérant que l'ABAP inhibe la contraction induite par le BaCl₂ par l'inhibition des canaux calciques de type L (Peluso et al., 2002).

6.5.4. Effets des espèces réactives de l'oxygène

Le peroxy-nitrite, un radical très réactif, induit la relaxation de l'œsophage de l'opossum (Uc et al., 2001). Par contre, il induit la contraction du muscle lisse de la vésicule biliaire du cobaye (Alcon et al., 2001). L'acide hypochloreux et le peroxyde d'hydrogène, formés par les macrophages activées, induisent la contraction du muscle lisse longitudinal de l'iléon du cobaye (Moumami et al., 1991). Dans des préparations longitudinales de l'iléon du cobaye, le H₂O₂ induit une dépolarisation de la membrane accompagnée d'une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des ondes lentes, ces changements sont accompagnés d'une contraction dont l'amplitude est comparable à celle de la contraction tonique induite par le KCl 50 mM (Rekalov et al., 2003). Cependant, la contraction induite des segments de l'iléon de cobaye par H₂O₂, OH[•] et O₂^{•-} est suivie par une relaxation; la contraction et la relaxation induites dépendent partiellement de la transmission cholinergique et adrénergique et de la présence de l'épithélium (Bauer et al., 1999). De même, le HOCl et le H₂O₂ induisent une contraction suivie d'une relaxation en réponse à la stimulation électrique du muscle lisse de l'iléon du cobaye, un effet

qui ne semble pas dépendre des prostaglandines ni des récepteurs muscariniques et nicotiniens (Moumami et al., 1991). Une réponse biphasique est aussi observée après le traitement de la trachée du cobaye avec le H_2O_2 et OH^\bullet ; par contre $\text{O}_2^{\bullet-}$ n'a aucun effet (Matyas et al., 2002). Dans le cas des bandelettes de la trachée débarrassées de leur épithélium, ces ROS induisent plutôt une contraction du muscle lisse plus importante que celle observée avec des segments intacts (Matyas et al., 2002). Cependant, le traitement de la trachée du chat avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ induit une réponse biphasique, une contraction suivie d'une relaxation tardive (30-45 min) et une augmentation du tonus de la contraction induite par la 5-HT. La contraction initiale disparaît avec l'inhibition de la superoxyde dismutase, suggérant que $\text{O}_2^{\bullet-}$ n'a pas d'effet sur le tonus des contractions et que le H_2O_2 formé par la SOD à partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ est responsable de cette réponse. De même, le H_2O_2 apparaît être responsable de l'augmentation du tonus et l'amplitude des contractions induites par la stimulation électrique, alors que le $\text{O}_2^{\bullet-}$ inhibe ces contractions et inhibe la transmission cholinergique et NANC (Bauer et al., 2000). Par contre, chez le lapin, l'application de OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou de H_2O_2 au muscle circulaire de la trachée induit une relaxation et inhibe la réponse à l'acétylcholine; la relaxation est plus faible aux fortes concentrations comparée aux faibles concentrations (Prasad et Gupta, 2002). La combinaison des purines avec la xanthine oxydase induit une contraction soutenue de l'artère coronaire du porc qui résulte de la production de OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 (Ishihara et al., 2008). Par contre, l'addition du peroxyde aux anneaux de l'artère coronaire du porc dénudée de son épithélium induit une contraction transitoire du muscle lisse (Grover et al., 1999). Dans l'artère coronaire du porc, le peroxyde d'hydrogène induit une relaxation des préparations musculaires pré-contractées par l'histamine et la prostaglandine F_2 et non par le KCl 80 mM, suggérant que les canaux potassiques sont impliqués dans cette relaxation (Barlow et White, 1998). Le H_2O_2 et la monochloramine induisent l'activation des canaux potassiques de large conductance et sensibles au calcium (BK) (Barlow et al., 2000; Prasad et al., 1999). Cet effet est augmenté par l'addition de l'acide arachidonique et disparaît avec l'inhibition de la lipoxigénase par l'acide eicosatrionique, suggérant que la relaxation de l'artère coronaire induite par le H_2O_2 fait intervenir l'activation des canaux BK et une signalisation par les leucotriènes (Barlow et White, 1998). L'inhibition de la cyclooxygénase par l'indométhacine augmente l'effet contractile des ROS, alors que l'inhibition de la lipoxigénase par l'acide nordihydroguaiarétique favorise la relaxation de la trachée du cobaye. Ces résultats montrent que l'effet relaxant des ROS résulte de l'action des produits de la cyclooxygénase alors que la contraction provient de l'effet des produits de la lipoxigénase (Matyas et al., 2002). Dans le cas du stress oxydatif induit par le cumène hydroperoxyde (un hydroperoxyde lipophile), la diminution de la contraction du muscle lisse de

la vessie du porc induite par les agonistes muscariniques et la stimulation électrique résulte de l'inhibition de la signalisation par les récepteurs muscariniques, alors que les canaux calciques de type L et la transmission nerveuse sont peu ou pas altérés par ce système oxydant (De Jongh et al., 2007). Le 4-hydroxy-2-nonéal (HNE), un produit issu de la peroxydation des lipides, induit la contraction du muscle lisse de la vessie de porc de manière dépendante de la concentration; mais il réduit la réponse au carbachol, à la stimulation électrique et au KCl. Comme la pD_2 du carbachol n'est pas modifiée, il semble que la signalisation par les récepteurs muscariniques n'est pas altérée par le HNE. Par contre, les effets cytotoxiques du HNE se manifestent par l'altération de l'activité des canaux calciques de type L et de l'appareil contractile (De Jongh et al., 2008).

La contraction du muscle lisse de la vésicule biliaire du cobaye induite par le peroxyde d'azote dépend de l'implication des leucotriènes et de l'entrée du calcium extracellulaire, car le méthoxyvérapamil inhibe la contraction induite par le peroxyde d'azote (Alcon et al., 2001).

La suppression du calcium du milieu d'incubation ou l'inhibition des canaux calciques de type L avec la nimodipine inhibe la contraction induite par le H_2O_2 , suggérant que le peroxyde d'hydrogène exerce ces effets en induisant l'entrée du calcium extracellulaire via les canaux calciques (Rekalov et al., 2003). L'effet contractile du radical hydroxyle sur les cellules musculaires de l'aorte résulte de l'augmentation du calcium intracellulaire, car l'élimination du calcium intra et extracellulaire avec un chélateur du Ca^{2+} (BAPTA) inhibe la contraction induite par le radical hydroxyle (Li et al., 2004).

Dans la majorité des cas, le OH^\bullet , $l'O_2^{\bullet-}$, le HOCl et le H_2O_2 induisent une contraction du muscle lisse du tube digestif, alors que la relaxation du muscle lisse de l'œsophage et du jéjunum est observée respectivement lors de l'utilisation du peroxyde d'azote et des radicaux peroxyde de l'ABAP. Dans certains cas, la contraction induite par le OH^\bullet , $l'O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 est suivie par une relaxation. Pour le muscle lisse de la trachée, le OH^\bullet , $l'O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 induisent une réponse biphasique: une contraction suivie par une relaxation tardive qui peut être observée après plusieurs minutes qui suivent l'application de ces ROS. L'espèce animale utilisée dans l'expérience influe sur la réponse du muscle lisse aux ROS. En effet, le OH^\bullet , $l'O_2^{\bullet-}$ et le H_2O_2 induisent une relaxation du muscle lisse de la trachée du lapin et une relaxation chez le chat et le cobaye. Les effets des ROS et des radicaux libres font intervenir plusieurs voies comme l'augmentation de l'influx du Ca^{2+} , l'activation de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase et l'activation ou l'inhibition d'une variété des canaux comme les canaux potassiques et calciques.

Matériels & méthodes

1. Préparation et mise en place des bandelettes

Les animaux utilisés dans les expériences sont des lapins (*Oryctolagus cuniculus*) des deux sexes et ayant un poids moyen de 1049 g (SD = 212 g). Les lapins sont fournis par des fermiers locaux et sont mis dans des cages où ils disposent de la nourriture et de l'eau à volonté.

Les animaux sont sacrifiés par exsanguination au niveau de la carotide. Après laparotomie ventro-médiane, une longueur approximative de 15 à 20 cm d'iléon est rapidement prélevée en amont de la jonction iléo-caecale. L'extrémité proximale est repérée par la pose d'une ligature, le tissu est ensuite débarrassé du mésentère et la lumière lavée avec le milieu physiologique préalablement aéré et chauffé à 37°C. Les cinq premiers centimètres de la partie distale de l'iléon sont éliminés et le reste du tissu est placé dans le milieu physiologique et aéré en continu jusqu'à son utilisation sous forme de bandelettes formé par le muscle longitudinale.

Des fragments de tissu sont excisés en partant de l'extrémité distale et en choisissant les régions dépourvues de plaques de Peyer. Le fragment d'iléon, d'environ 3 cm de long, est placé à plat sur un bloc de cire dentaire et fixé à l'aide d'aiguilles entomologiques aux quatre coins puis excisé le long de la ligne mésentérique. Les quatre bords de la section sont rabattus et maintenus en place par des aiguilles. Des bandelettes d'une largeur de 2 à 3 mm sont découpées selon l'axe longitudinal du fragment. Un fil noué en boucle est placé sur l'extrémité distale de la bandelette et un autre sur l'extrémité proximale.

Chaque bandelette est placée dans une chambre à organe de 5 ml contenant le milieu physiologique aéré et chauffé à 37°C. La bandelette est fixée par le fil en boucle au crochet inférieur d'un support spécial qui permet en outre d'aérer le milieu physiologique, de stimuler électriquement le tissu à l'aide d'électrodes en anneaux (Fig. 7). Le tissu est maintenu verticalement en fixant le fil proximal au bras du transducteur de force (FSG-01/3, Experimetria, Budapest, Hongrie) relié à un amplificateur/conditionneur de signaux (EXP-D, Experimetria, Budapest, Hongrie). Le signal amplifié est envoyé vers une carte d'acquisition (DI 700-PGL USB, DataQ, Ohio, USA) pour le stockage numérique des données dans le PC.

Les transducteurs de force sont calibrés chaque jour d'expérience grâce au logiciel WinDaq Lite (DataQ, Ohio, USA). L'enregistrement est mis en marche pendant quelques minutes à une vitesse d'échantillonnage de 2 Hz pour mesurer le potentiel du zéro. Un poids de 1 g est ensuite placé sur le bras du transducteur et le nouveau potentiel est utilisé par le logiciel pour calculer le facteur de conversion des millivolts en grammes.

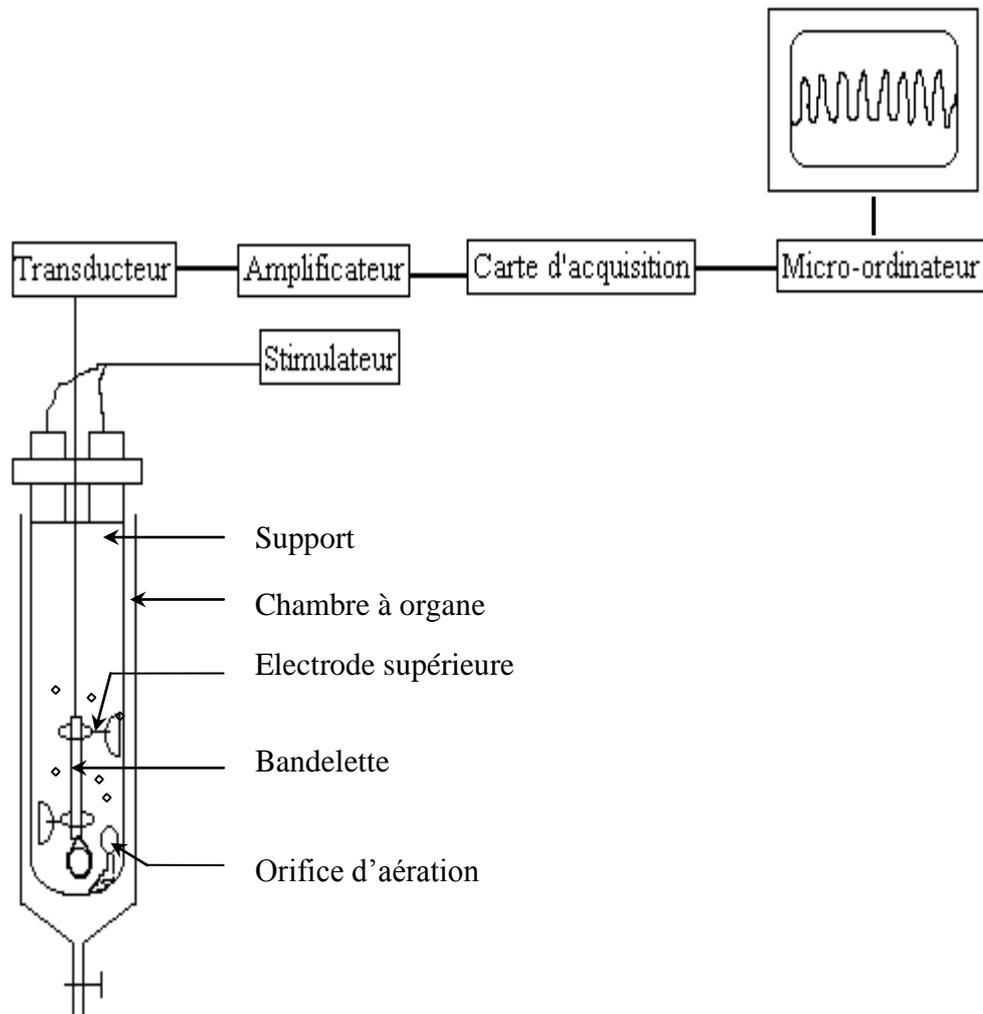


Figure 7. Schéma du dispositif du montage des bandelettes et d'enregistrement de la contraction du muscle lisse de l'iléon de lapin.

Une fois les tissus montés dans les chambres à organe et les transducteurs calibrés, une tension de 1g est appliquée sur chaque tissu grâce à un micro-positionneur solidaire du transducteur de force. Les bandelettes sont stabilisées pendant 30 à 45 minutes, une durée pendant laquelle le milieu physiologique est renouvelé chaque 15 minutes; cette phase est appelée période de stabilisation.

Un test de contraction avec le carbachol 1 μ M est appliqué pour vérifier la viabilité et la performance du tissu. Dès que le pic de contraction apparaît, le milieu d'incubation est renouvelé afin d'éliminer le carbachol et de permettre au tissu de retrouver sa tension initiale. Une période de 15 à 30 minutes permettra au tissu de se stabiliser et servira comme période basale pour les comparaisons avec les périodes de test des diverses substances.

Pour obtenir la relaxation maximale du muscle, la papavérine 100 μM , un inhibiteur non sélectif de la phosphodiesterase (Fujimoto *et al.*, 2006) est ajoutée à la fin de chaque expérience et cela après une période de repos de 15 min.

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Effet de l'ABAP sur la contraction spontanée de l'iléon

L'expérience commence par une stimulation du tissu par le carbachol 1 μM , suivie directement par une période de stabilisation de 15 minutes. A la fin de cette période, les fragments de tissu sont soumis à différentes concentrations de peroxy ABAP 0, 49 et 98 μM pendant 30 min. Ces concentrations sont obtenues en remplaçant 166.7 μl du milieu d'incubation par le même volume de la solution d'ABAP 600 mM préalablement incubées à 37°C pendant 0, 30 et 60 minutes. Passé ce temps, le milieu est renouvelé et le tissu laissé se stabiliser pendant 15 minutes.

Une deuxième application de peroxy ABAP (98 μM) est réalisée pour une durée de 30 minutes. A la fin de cette période, le tissu est stimulé par l'addition du carbachol 1 μM pour vérifier l'effet de l'ABAP sur la contraction induite par le carbachol.

Pour tester l'effet possible de l'osmolarité de la solution d'ABAP sur la contraction spontanée des bandelettes, une chambre est réservée à l'addition du mannitol 600 mM pour obtenir une concentration finale de mannitol 20 mM selon le même protocole décrit.

2.2. Effet du t-BHP sur la contraction spontanée de l'iléon

Le tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP), est un hydroperoxyde organique générateur de radicaux oxygénés (Taffe *et al.*, 1987).

A la fin de la période basale, une stimulation avec le carbachol 1 μM est appliquée puis elle est suivie par un lavage et une période de stabilisation de 15 min. Passé ce temps, le t-BHP est ajouté pendant 15 min de façon cumulée au milieu physiologique pour obtenir des concentrations allant de 0.03 à 1 mM. A la fin de cette période, la contraction de l'iléon est stimulée par une du carbachol 1 μM pour vérifier l'influence du t-BHP sur la contraction induite par le carbachol.

2.3. Effet de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction stimulée

2.3.1. La contraction induite par le KCl ou le BaCl₂

Pour la sélection des tissus qui répondent à une stimulation dépolarisante, 100 μl du milieu d'incubation sont remplacés par le même volume de KCl 4 M pour obtenir une concentration

finale de 80 mM. Le KCl est laissé au contact du tissu pendant une durée (30 sec) nécessaire à l'apparition du pic de la contraction phasique, le milieu est ensuite renouvelé et le tissu laissé reposer pendant 15 minutes. Le tissu est stimulé une deuxième fois par le KCl 80 mM ou le BaCl₂ 5 mM pendant 15 minutes; le milieu est ensuite renouvelé et le tissu laissé reposer pendant 20 à 30 minutes selon que le vérapamil 1 μM est ajouté ou non au milieu d'incubation avec renouvellement du milieu.

Pour tester l'effet du t-BHP 1 mM et de l'ABAP 20 mM (peroxyl ABAP 98 μM) et 40 mM (peroxyl ABAP 196 μM) sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂ (30 min), ceux-ci sont ajoutés au milieu 15 min (t-BHP 1 mM, peroxyl ABAP 96 μM) ou 20 min (peroxyl ABAP 196 μM) avant la stimulation.

L'effet de l'ABAP est également testé après le blocage des canaux calciques de type L avec vérapamil 1 μM (Grasa et al., 2004). La chambre servant de contrôle reçoit le milieu physiologique à la place du vérapamil.

2.3.2. La contraction induite par la stimulation électrique

Les bandelettes d'iléon sont placées entre les deux électrodes du support de la chambre à organe. Ces électrodes sont sous forme d'anneaux créant un champ électrique lorsqu'elles sont traversées par un courant électrique. Les électrodes sont connectées à un stimulateur formé de deux unités: l'unité de contrôle (EXP.MCU, Experimetria, Budapest, Hongrie) permet de fixer la période, la longueur des impulsions, le type (continue/discontinue) et la durée totale de la stimulation. L'unité analogique (EXP-ST-CH2, Experimetria, Budapest, Hongrie) permet de choisir l'amplitude (voltage/intensité) et la polarité (positive/négative) de la stimulation.

Le tissu répond efficacement à une stimulation continue de 30 V à une fréquence de 20 Hz (durée des impulsions 0.5 msec). Les bandelettes sont stabilisées dans ces conditions de stimulation pendant 30 minutes avec le renouvellement du milieu toutes les 15 min. La solution de peroxyl ABAP 98 μM est ajoutée au milieu d'incubation sans interrompre la stimulation électrique.

2.4. Etude pharmacologique de la réponse du muscle lisse à l'ABAP

Plusieurs substances pharmacologiques (antagonistes des canaux potassiques, inhibiteurs des enzymes impliquées dans la médiation par les dérivées de l'acide arachidonique, modificateur de réserve de calcium, agoniste adrénergique, antagoniste cholinergique, inhibiteur de la conduction nerveuse) sont appliquées pour étudier le mécanisme d'action de l'ABAP.

De manière générale, ces substances sont laissés au contact du tissu pendant 15-20 min selon le cas avant d'ajouter le peroxyl ABAP 98 μM pour une durée de 15 min.

2.4.1. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse

L'hexaméthonium 100 μM , un antagoniste des récepteurs nicotiques ganglionnaires (Baldassano et al., 2008), l'atropine 1 μM , un antagoniste des récepteurs muscariniques (Sales *et al.*, 1997) et la lidocaïne 100 μM , un agent inhibiteur de la conduction nerveuse (Borjesson et al., 1997), sont appliqués pendant 15 minutes avant l'addition du peroxy ABAP.

2.4.2. Effet de l'isoprotérénol

L'isoprotérénol 100 μM , un agoniste des récepteurs β -adrénergiques (De Ponti et al., 1999), est ajouté pendant 15 minutes avant l'addition du peroxy ABAP.

2.4.3. Effets des antagonistes des canaux potassiques

Le tétraéthylammonium (TEA) est un bloqueur non sélectif des canaux K^+ , il peut inhiber un certain nombre de canaux K^+ (Dong *et al.*, 2005). La 4-aminopyridine (4-AP) est utilisé pour bloquer les canaux K^+ voltage-dépendants (Alberti et Jimenez, 2005). Le clotrimazole est un inhibiteur d'une variété de canaux ioniques, incluant les canaux K^+ activés par le calcium (Benton et al., 1999).

Le TEA 5 mM, la 4-AP 4 mM et le clotrimazole 30 μM sont ajoutés au milieu d'incubation 20 minutes avant l'addition du peroxy ABAP. A la fin de cette période, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants sont bloqués par le vérapamil 1 μM en présence du peroxy ABAP pour une durée de 15 min.

2.4.4. Effet de la déplétion des réserves du Ca^{2+}

La caféine est utilisée pour vider les réserves intracellulaires de Ca^{2+} en activant les récepteurs sensibles à la ryanodine (Morales *et al.*, 2005). Pour cela, les bandelettes sont incubées pendant 15 minutes en présence de la caféine 20 mM pour ajouter ensuite la solution de peroxy ABAP au milieu d'incubation.

2.4.5. Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) 30 μM est un inhibiteur de la 5-lipoxygénase (Campbell et al., 2003), la quinacrine 10 μM est un inhibiteur de la phospholipase A_2 (Criswell et Loch-Caruso, 1999), l'indométhacine 10 μM est un inhibiteur non sélectif de la cyclo-oxygénase (Koyluoglu et al., 2008). Ces substances sont ajoutées au milieu d'incubation pendant 20 minutes avant l'addition du peroxy ABAP au milieu d'incubation.

2.4.6. Inhibition des tyrosines phosphatases

Le vanadate, un inhibiteur des tyrosines phosphatases (Alcon *et al.*, 2000), est capable d'induire la contraction du muscle lisse. L'orthovanadate de sodium est laissée agir pendant 30 min avant l'addition du peroxy ABAP.

3. Evaluation de la contraction de l'iléon

Lorsque les bandelettes de l'iléon présentent des contractions phasiques, quatre paramètres sont mesurés pour caractériser ces contractions. Ces paramètres sont la tension, le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions. Les mesures sont effectuées à l'aide des procédures implantées dans le programme Chart (ADInstruments, Castle Hill, Australie).

L'évaluation est effectuée sur une période de 5 minutes et concerne la tension (la moyenne des tensions maximales des contractions), le tonus basal ou de repos (moyenne des tensions minimales), l'amplitude et la fréquence des contractions (Fig. 8).

Dans le cas où le tissu présente une contraction tonique (KCl, BaCl₂), la tension est calculée sur les cinq dernières minutes de la période d'incubation; alors que dans la relaxation totale (isoprotérénol, vérapamil, caféine, papavérine), seul le tonus de repos est mesuré. En plus de la période de 5 minutes, ces mêmes paramètres (tension, tonus, et amplitude fréquence) sont mesurés chaque 5 minutes, en mesurant les paramètres de 5 contractions successives.

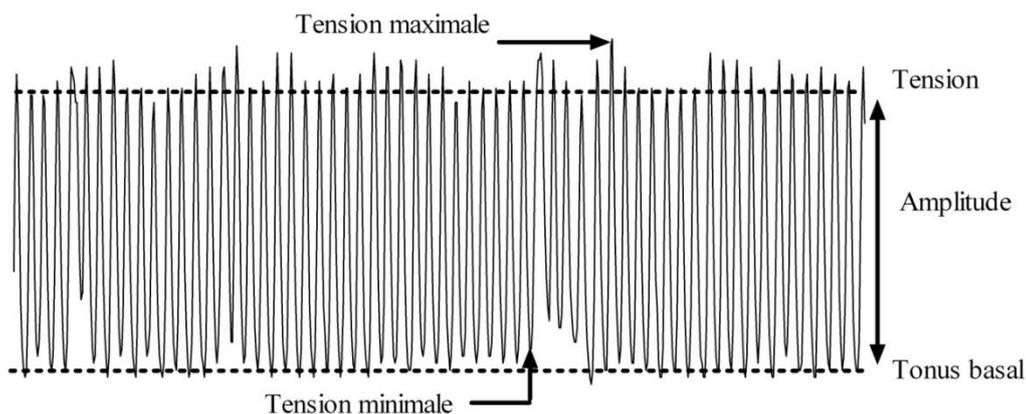


Figure 8. Schéma illustrant les paramètres utilisés pour évaluer la contraction spontanée des bandelettes d'iléon de lapin.

4. Produits chimiques et solutions utilisées

Les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique. Ils sont fournis par Sigma (St Louis, USA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Allemagne) et Fluka (Buchs, Suisse).

Le milieu physiologique est préparé selon la composition décrite par Kwon et ses collaborateurs (2000): NaCl 126 mM, KCl 6 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 2 mM, EDTA 0.01 mM, HEPES 10.5 mM et glucose 14 mM. Pour préparer un litre de milieu physiologique 100 ml de la solution A sont mélangés à 200 ml de la solution B; 2.522 g de glucose sont ajoutés avant d'ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau distillée. La solution A est composée de (mM): NaCl 1260, KCl 60, MgCl₂ 12, CaCl₂ 20 et EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique) 0.1. La solution B correspond à la solution de HEPES (acide N-[2- hydroxyéthyl] pipérazine-N`-[4-butane sulfonique] 52.5 mM ajustée à pH 7.4 avec de la NaOH 1 M (pH-mètre Orion EA 940, Boston, USA).

Les diverses substances testées sont préparées sous forme de solutions stocks et diluées au besoin comme décrit dans le tableau 1. Les solutions stocks et leurs dilutions sont préparées quotidiennement et conservées à 4°C sauf les solutions préparées dans le DMSO et les solutions salines.

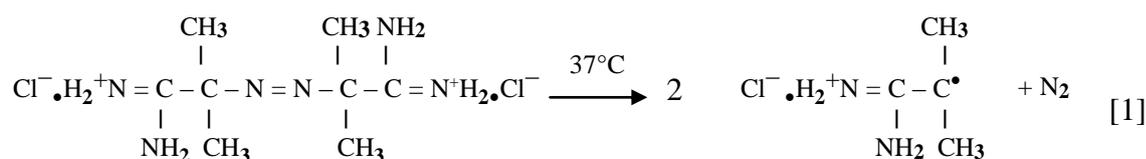
Tableau 1. Conditions d'emploi des substances chimiques testées.

Substance	Solution stock (mM)	Solvant	Solution test (mM)	Concentrations finales à tester	Volume total (µl)
4-AP	400	DMSO	-	4 mM	50 *
Atropine	10	Eau dist.	1	1 µM	5
BaCl ₂	1.2 M	Eau dist.	-	5 mM	20.8
t-BHP	6.99 M	Eau dist.	25, 50, 100, 500	0.03-1 mM	30
Carbachol	100	Eau dist.	10, 1	1 µM	5
Clotrimazole	30	DMSO	-	30 µM	5
Hexaméthonium	100	Eau dist.	-	100 µM	5
Indométhacine	33.33	Ethanol	10	10 µM	5
Isoprotérénol	100	Eau dist.	-	100 µM	5
KCl	4 M	Eau dist.	-	80 mM	100 *
Lidocaïne	100	Eau dist.	-	100 µM	5
NDGA	50	Ethanol	30	30 µM	5
Papavérine	100	Eau dist.	-	100 µM	5
Quinacrine	50	Ethanol	10	10 µM	5
TEA	500	Eau dist.	-	5 mM	50 *

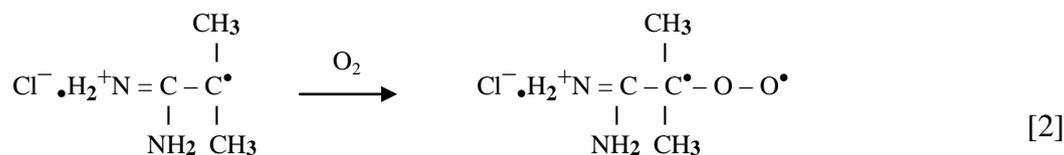
* : Addition par substitution; Eau dist. : Eau distillée

Les concentrations des solutions stocks sont choisies de sorte à ajouter un volume minimal de solvant dans les chambres. En effet, le volume de solution ajouté représente 0.1% dans la majorité des cas et peut aller jusqu'à le maximum 0.6%. La condition de contrôle est réalisée simultanément en ajoutant un volume équivalent de solvant dans la chambre à organe.

L'ABAP (soluble dans le milieu physiologique) se décompose sous l'effet de la température en radicaux peroxy avec la libération de l'azote moléculaire [1]. Les radicaux (R[•]) formés peuvent s'unir et donner un produit stable (R-R), d'autres réagissent rapidement avec l'oxygène moléculaire pour donner les radicaux peroxy (ROO[•], équation 2). (Peluso *et al.*, 2002)



2,2'-Azobis (2-méthylpropionamidine) dihydrochlorure



2-méthyl 2-peroxypropionamidine hydrochlorure

A 37°C et à pH 7, la demi-vie de l'ABAP est de 175 heures, ce qui implique que la vitesse de génération des radicaux peroxy est constante pendant les premières heures. La concentration des radicaux peroxy formés à 37°C est calculée à partir de l'équation [3] (Niki, 1999). Cette propriété de l'ABAP permet donc de préparer des solutions de peroxy ABAP en faisant varier la durée d'incubation d'une solution concentrée dans un bain-marie (37°C).

$$[\text{Peroxy}] = 1.36 \times 10^{-6} [\text{ABAP}] t \quad [3]$$

[Peroxy] : concentration totale des radicaux peroxy formés (M).

1.36×10^{-6} : constante de décomposition (S^{-1}).

[ABAP] : concentration de l'ABAP (M).

t = temps d'incubation à 37°C (secondes).

5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm SEM (n = nombre d'animaux). Le test de Student pour valeurs appariées est effectué pour les comparaisons entre les différents traitements appliqués sur le même segment. La différence entre les segments témoins et les

segments traités est déterminée par le test de Student. L'analyse de la variance à un, deux ou trois facteurs est appliquée lorsque les résultats proviennent de plusieurs traitements. Elle est suivie de la comparaison multiple des moyennes (test de Tukey) pour étudier l'effet du peroxy ABAP sous le blocage des canaux K^+ (un facteur), l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique, l'inhibition de la médiation cholinergiques et de la conductance nerveuse (trois facteurs). La comparaison des moyennes au témoin (test de Dunnett) est effectuée pour étudier les effets de l'ABAP (deux facteurs) et du BHP (un facteur) sur la contraction spontanée. La différence est considérée statistiquement significative au risque de 5%.

Résultats

1. Activité contractile spontanée

L'étirement des bandelettes longitudinales par une tension initiale de 1g induit l'apparition d'une activité contractile spontanée phasique (Fig. 9). Les contractions phasiques se manifestent par une amplitude de 0.5 ± 0.03 g ($n = 40$) et se stabilisent aux alentours d'un tonus basal de 0.30 ± 0.02 g ($n = 40$) avec une fréquence des oscillations de 10.5 ± 0.2 contraction par minute (cpm) ($n = 40$). La durée moyenne de chaque contraction est de 5 à 6 secondes.

2. Effets de l'ABAP sur la contraction spontanée

Pour tester l'effet du peroxy ABAP à différentes concentrations sur la contraction spontanée, les bandelettes de l'iléon sont incubées pendant 30 minutes en présence du peroxy ABAP 0, 49 et 98 μ M. Une deuxième application du peroxy ABAP 98 μ M est réalisée pour vérifier l'effet du prétraitement des bandelettes avec le peroxy ABAP sur une ré-application de ces radicaux peroxy. Parallèlement, des bandelettes sont incubées en présence du mannitol 20 mM pour vérifier l'effet osmotique possible de la concentration de l'ABAP 20 mM sur la contraction spontanée.

De manière générale, l'addition du peroxy ABAP entraîne un arrêt des contractions phasiques (silence) pendant 2 à 4 min (Fig. 10). Par la suite, le muscle reprend son activité mécanique avec une amplitude qui augmente graduellement avec le temps. Cependant, une diminution du tonus de repos et de la fréquence des contractions marque toute la période d'application du peroxy ABAP.

L'addition du mannitol au milieu d'incubation n'entraîne aucune modification dans l'ensemble des paramètres de la contraction. Le tonus de repos est de 0.34 ± 0.01 g ($n = 6$, $P > 0.05$), l'amplitude de 0.29 ± 0.02 g ($n = 6$, $P > 0.05$) et la fréquence des contractions de 10.7 ± 0.5 cpm ($n = 6$, $P > 0.05$). Ces valeurs représentent les moyennes communes calculées de la cinquième à la dernière minute de l'incubation. L'osmolarité du milieu d'incubation n'a donc pas d'effet sur la contraction spontanée du muscle lisse de l'iléon (Fig. 10).

2.1. Le silence et le tonus

Dès que la solution de peroxy ABAP est ajoutée au milieu d'incubation, l'activité contractile spontanée s'arrête pendant un certain temps (silence) dont la durée varie selon la concentration de peroxy ABAP utilisée. Les durées du silence obtenues avec les différentes concentrations de peroxy ABAP ne sont pas différentes les unes des autres ($P > 0.05$; Fig. 11).

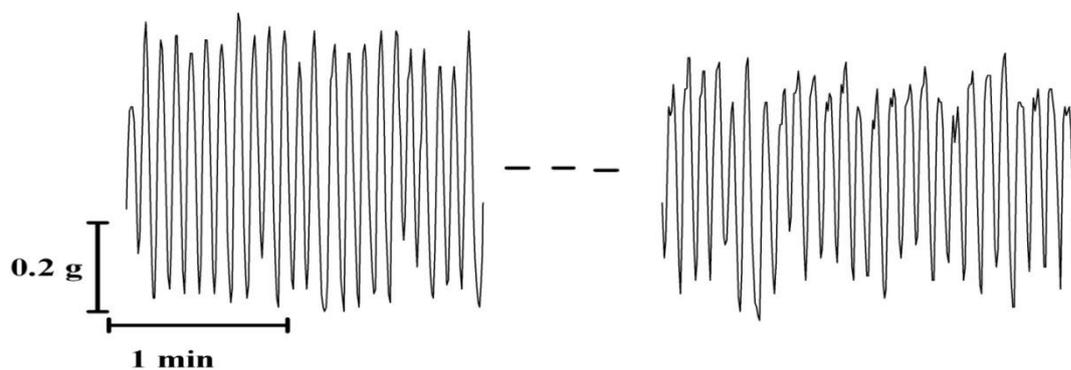


Figure 9. Enregistrement typique des contractions phasiques des bandelettes de l'iléon du lapin

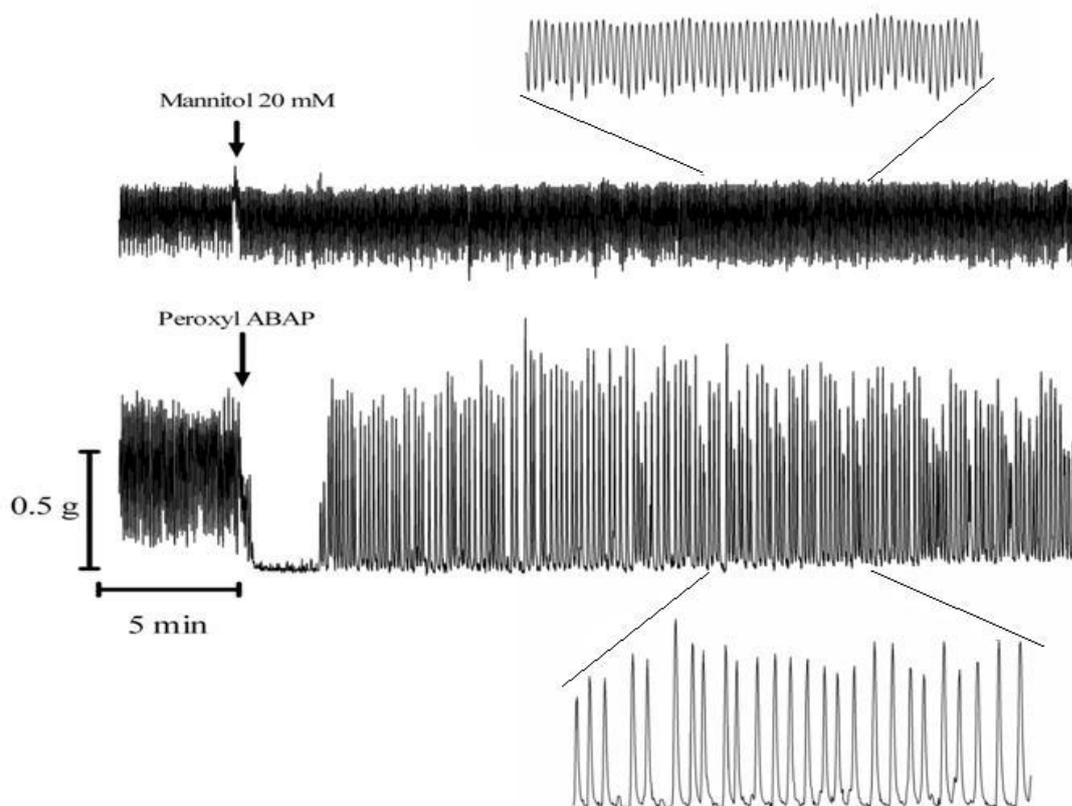


Figure 10. Enregistrements typiques des contractions phasiques des bandelettes de l'iléon du lapin en présence de l'ABAP et du mannitol.

Dans une autre série d'expériences, l'augmentation de la concentration du peroxy ABAP à 196 μM induit un silence prolongé (460 ± 45 s, $n = 7$, $P > 0.05$). Une deuxième application de peroxy ABAP induit une diminution de la durée du silence, cette diminution est significative pour les tissus prétraités avec le peroxy ABAP 49 μM ($P \leq 0.05$; Fig. 11). Les durées du silence obtenues lors de la deuxième application du peroxy ABAP ne sont pas différentes entre elles ($P > 0.05$; Fig. 11).

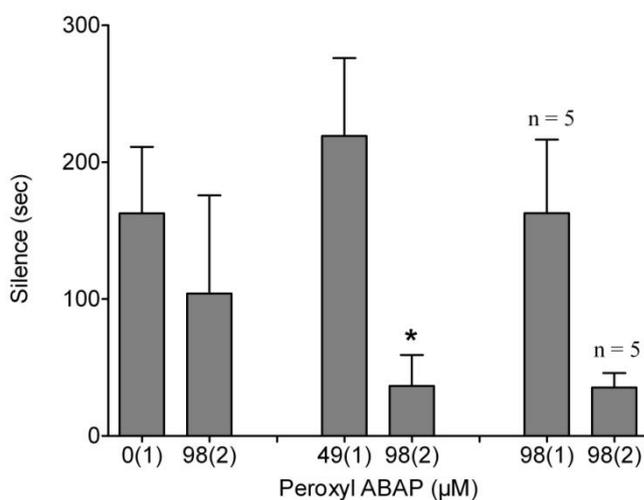


Figure 11. Silence induit par la première (1) et la deuxième (2) application du peroxy ABAP. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 6$ sauf indication). * $P \leq 0.05$.

Exprimé en terme de tension, le tonus de repos des contractions noté avec le peroxy ABAP 0 μM n'est pas modifié par l'augmentation de la concentration à 49 et 98 μM ($P > 0.05$; Fig. 12). Dès les cinq premières minutes d'incubation avec le peroxy ABAP 0, 49 et 98 μM , le tonus est diminué à 0.19 ± 0.02 g (moyenne commune) ($n = 6$, $P > 0.05$) puis il augmente graduellement pour atteindre à la fin de l'incubation 0.26 ± 0.04 g (moyenne commune), une valeur qui n'est pas différente de la valeur basale ($P > 0.05$; Fig. 12C). Dans la série d'expérience où la concentration du peroxy ABAP est augmentée à 196 μM , le tonus de repos est diminué de 52.5% ($P \leq 0.05$). La diminution du tonus est également exprimée en pourcent de relaxation par rapport à celle induite par la papavérine 100 μM (100%). Les pourcentages de relaxation notés à la cinquième minute sont proches de 70% ($n = 6$, $P \leq 0.05$) pour les tissus traités avec le peroxy ABAP 0, 49 et 98 μM (Fig. 12D-F). Au cours du temps, la relaxation va diminuer graduellement pour atteindre à la dernière minute d'incubation des taux compris entre 36 et 44% (Fig. 12D-F).

La comparaison du tonus basal avant et après l'élimination de l'ABAP ne montre aucune différence significative ($P > 0.05$), ce qui reflète l'effet réversible de ce générateur de radicaux peroxy (Fig. 12A-C). Cependant, la variabilité des mesures du tonus basal augmente avec la concentration de peroxy ABAP.

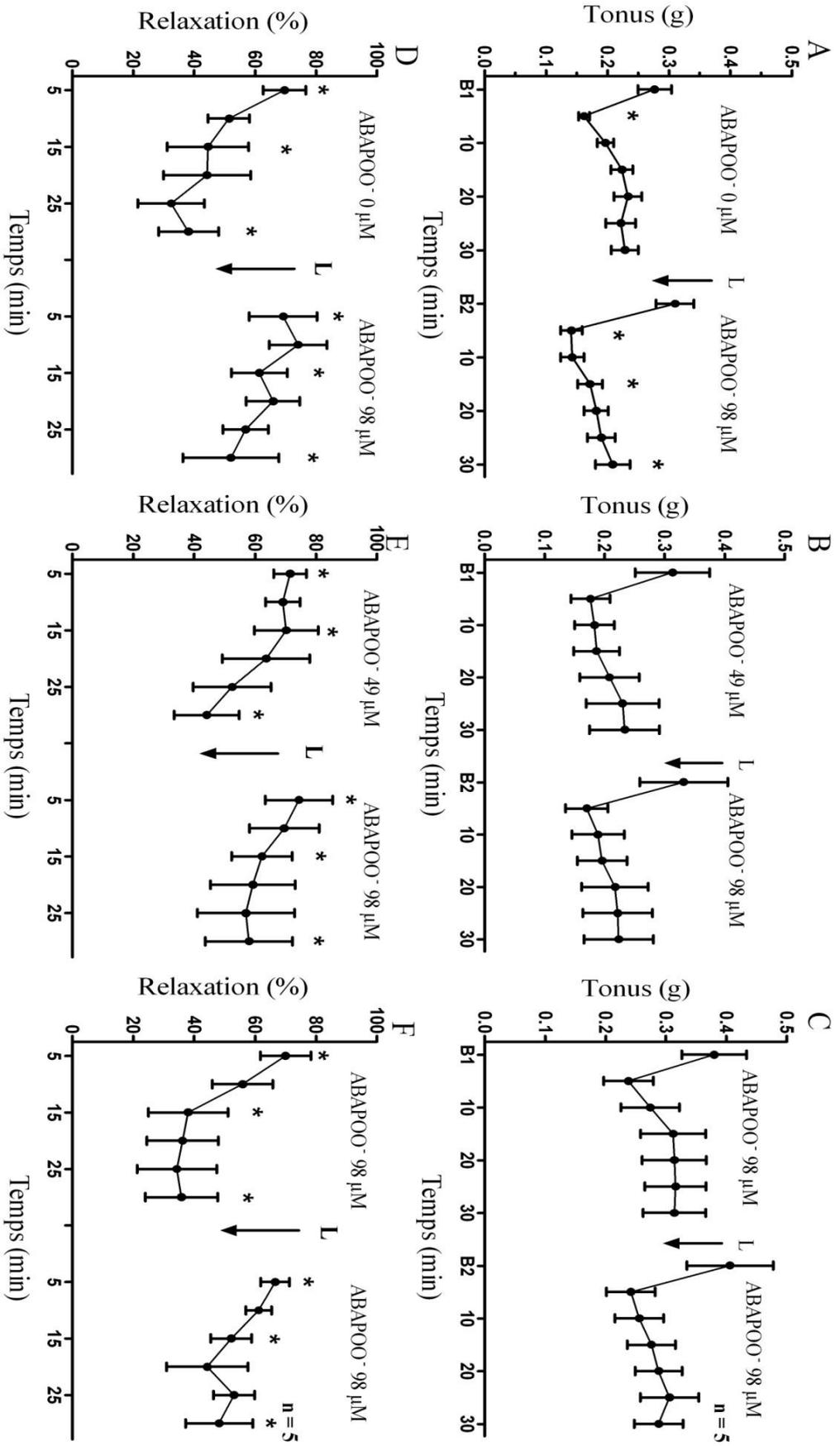


Figure 12. Effets du peroxy ABAP (ABAPPOO) 0, 49 et 98 µM sur le tonus de repos de la contraction spontanée des bandelettes de l'iléon de lapin. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6 sauf indication). La relaxation est exprimée en pourcent par rapport à la relaxation induite par la papavérine 100 µM (100%). * P<0.05 comparaison par rapport au basal (B1, B2) ou par rapport à 0% pour la relaxation.

Une deuxième application du peroxy ABAP 98 μM diminue de manière significative le tonus de repos au cours de toute la période d'incubation pour les tissus prétraités avec le peroxy ABAP 0 μM (basal: 0.30 ± 0.03 g, $n = 6$; peroxy ABAP 0 μM : 0.21 ± 0.02 g, $n = 6$; $P \leq 0.05$). Cet effet disparaît avec les concentrations 49 et 98 μM (Fig. 12B-C). Le pourcentage de relaxation obtenu à la cinquième minute est de $70.0 \pm 9.1\%$ ($n = 6$, $P \leq 0.05$) et atteint $52.7 \pm 13.7\%$ ($n = 6$, $P \leq 0.05$) à la dernière minute d'incubation avec les différentes concentrations de peroxy ABAP.

2.2. L'amplitude

L'amplitude des contractions phasiques notée en présence du peroxy ABAP 0 μM n'est pas changée lorsque cette dernière est augmentée à 49 et 98 μM ($P > 0.05$; Fig. 13A-C). Après la période du silence et à la cinquième minute, le tissu présente une activité phasique dont l'amplitude est de 0.35 ± 0.04 g ($n = 6$, $P > 0.05$), 0.27 ± 0.07 g ($n = 6$, $P > 0.05$), 0.35 ± 0.04 g ($n = 6$, $P > 0.05$) pour les tissus traités avec les concentrations respectives 0, 49 et 98 μM (Fig. 13A-C). L'amplitude notée après la quinzième minute a tendance à augmenter mais de manière non significative ($P > 0.05$; Fig. 13A-C). Le remplacement du milieu d'incubation permet au tissu de retrouver l'amplitude initiale des contractions, cette dernière est de 0.39 ± 0.06 g ($n = 6$, $P > 0.05$; Fig. 13A-C). Une deuxième application de peroxy ABAP a les mêmes effets que ceux de la première addition: une légère diminution suivie d'une augmentation de l'amplitude, mais de manière non significatives (Fig. 13A-C). Dans une autre série d'expériences, l'utilisation du peroxy ABAP 196 μM induit une augmentation de l'amplitude des contractions de 62.5% ($P \leq 0.05$).

2.3. La fréquence

L'addition du peroxy ABAP 0, 49 et 98 μM diminue significativement la fréquence des contractions pour atteindre à la cinquième minute respectivement 7.8 ± 1.1 cpm (basal : 11.6 ± 1.1 cpm, $n = 6$, $P \leq 0.05$), 7.0 ± 1.7 cpm (basal : 10.5 ± 0.5 cpm, $n = 6$, $P \leq 0.05$) et 4.9 ± 0.6 cpm (basal : 10.4 ± 0.4 cpm, $n = 5$, $P \leq 0.05$), une diminution qui s'explique par le silence noté juste après l'addition du peroxy ABAP. Avec le temps, le tissu reprend une activité mécanique similaire à celle de l'état basal dont la fréquence à la fin de l'incubation est en moyenne 9.4 ± 0.3 cpm pour les trois concentrations de peroxy ABAP ($n = 6$, $P > 0.05$; Fig. 13D-F).

Une deuxième application de peroxy ABAP a les mêmes effets sur la fréquence des contractions que lors de sa première addition: une légère diminution puis une augmentation de la fréquence (Fig. 13D-F). Dans une autre série d'expériences, l'incubation des bandelettes avec le peroxy ABAP 196 μM ne modifie pas la fréquence des contractions ($P > 0.05$).

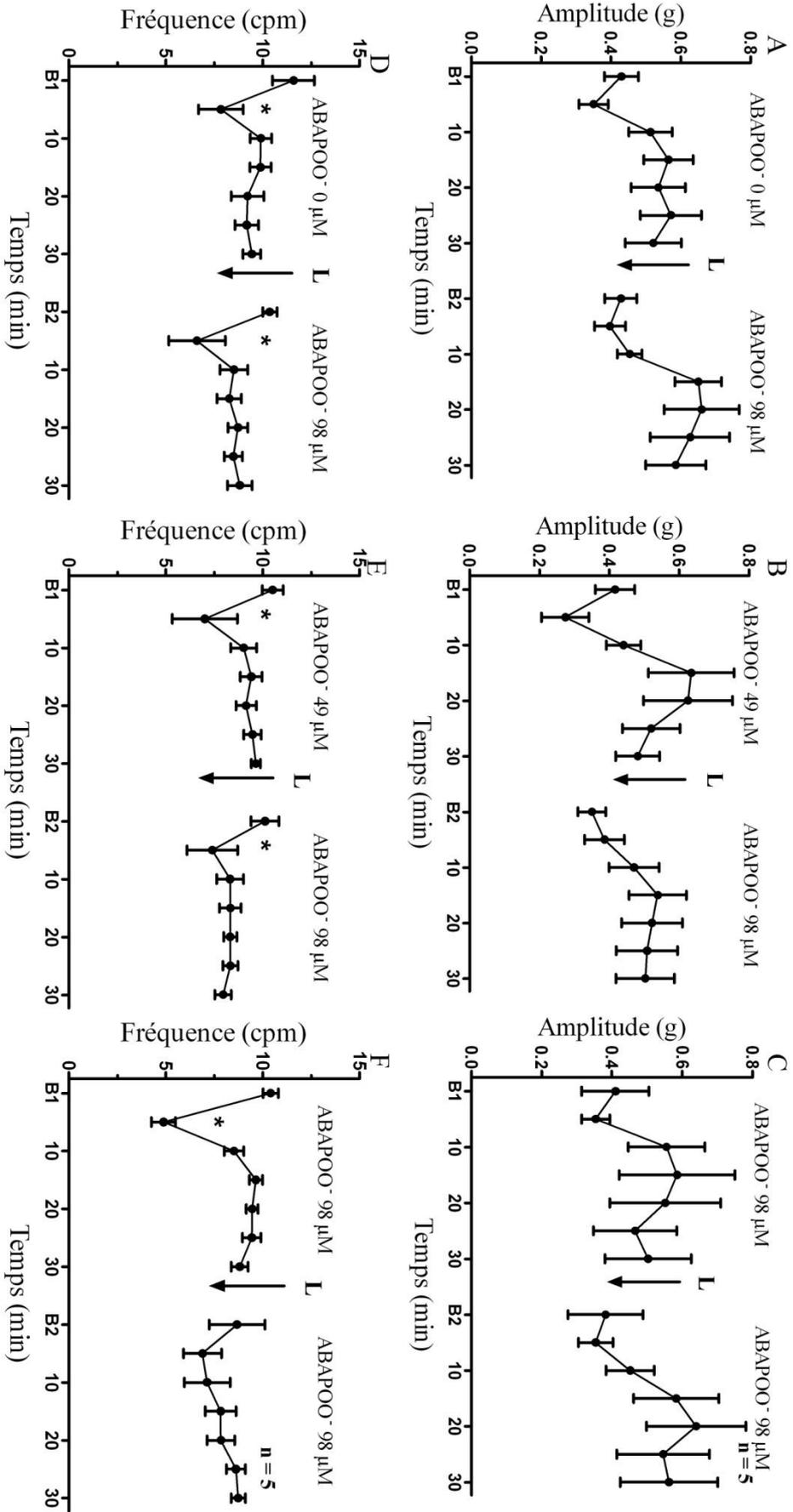


Figure 13. Effet du peroxy ABAP (ABAPPOO) 0, 49 et 98 μM sur l'amplitude et la fréquence de la contraction spontanée des bandelettes de l'iléon de lapin. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 6 sauf indication). * P≤0.05 comparaison par rapport au basal (B1, B2).

3. Effets du tert-butyl hydroperoxide sur la contraction spontanée

Le t-BHP est ajouté de façon cumulée (0.03 - 1 mM) au milieu d'incubation, avec une durée de contact de 15 minutes pour chaque concentration. L'enregistrement typique montre que le tonus de repos et l'amplitude des contractions diminuent graduellement en fonction de la concentration du t-BHP ajoutée au milieu d'incubation (Fig. 14).

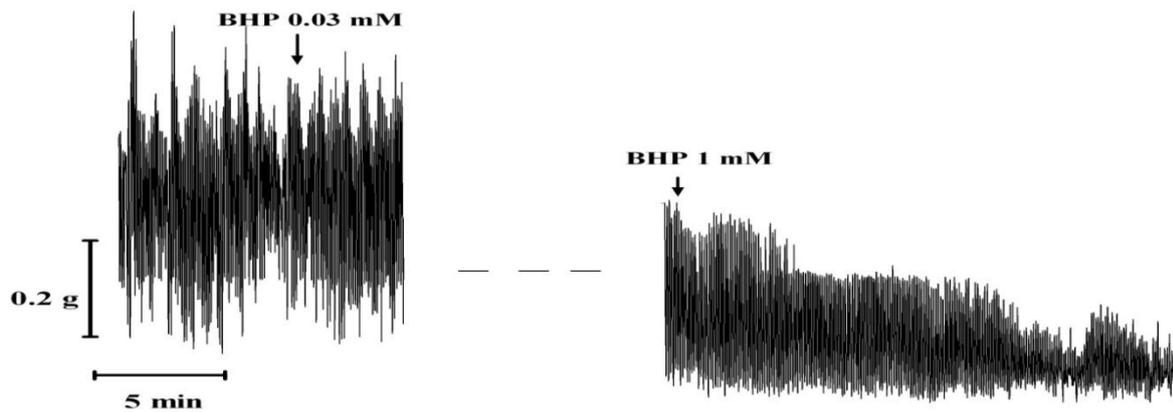


Figure 14. Enregistrement typique de l'effet de l'addition du BHP à des concentrations cumulées (0.03 - 1 mM) sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin.

Le t-BHP diminue le tonus de repos des contractions d'une manière qui dépend de la concentration pour atteindre le seuil de signification à partir de 0.3 mM (basal: 0.38 ± 0.03 g, $n = 5$; t-BHP 1 mM: 0.2 ± 0.03 g, $n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 15A). Cet effet sur le tonus est confirmé par l'expression de sa valeur par rapport à celle notée en présence de la papavérine 100 μ M (100% de relaxation). Dans ce cas, la relaxation est significative à partir de la concentration 0.03 mM ($21.7 \pm 0.9\%$, $n = 5$) et elle augmente graduellement pour atteindre $79.0 \pm 9.7\%$ ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 16B). L'amplitude des contractions spontanées diminue graduellement en fonction de la concentration du t-BHP, elle passe de 0.54 ± 0.07 g ($n = 5$) à 0.28 ± 0.04 g ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 15C) en présence du t-BHP 1 mM. Par contre, la fréquence des contractions n'est pas modifiée ($P > 0.05$; Fig. 15D).

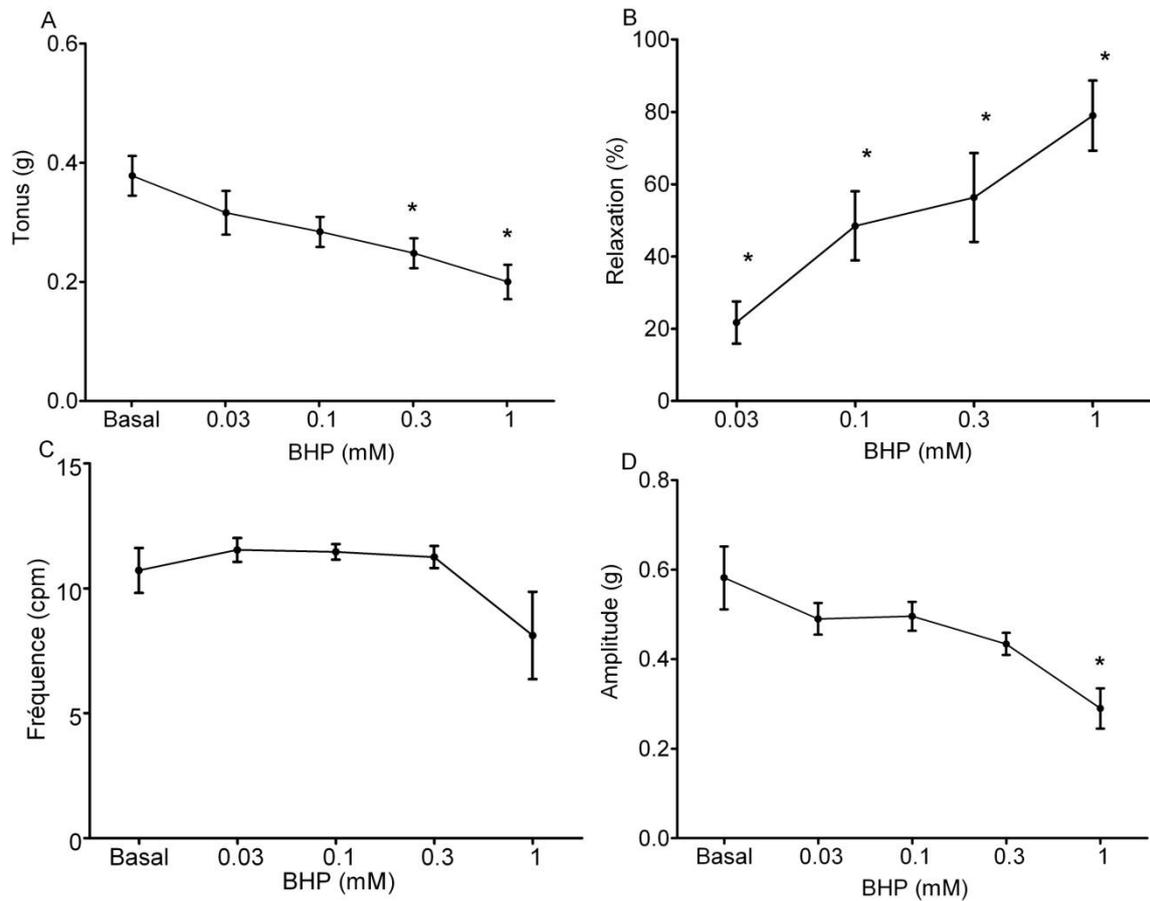


Figure 15. Effets du BHP sur la contraction spontanée des bandelettes de l'iléon de lapin. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5) *: comparaison par rapport au basal ou à 0% dans le cas de la relaxation.

4. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction stimulée

4.1. Contraction induite par le carbachol

Le traitement des bandelettes avec différentes concentrations de peroxy ABAP entraîne une légère diminution de la contraction phasique induite par le carbachol 1 μ M ($P > 0.05$). Les taux de diminution sont compris entre 17% et 39% pour les tissus traités avec le peroxy ABAP 0, 49 et 89 μ M (Fig. 16)

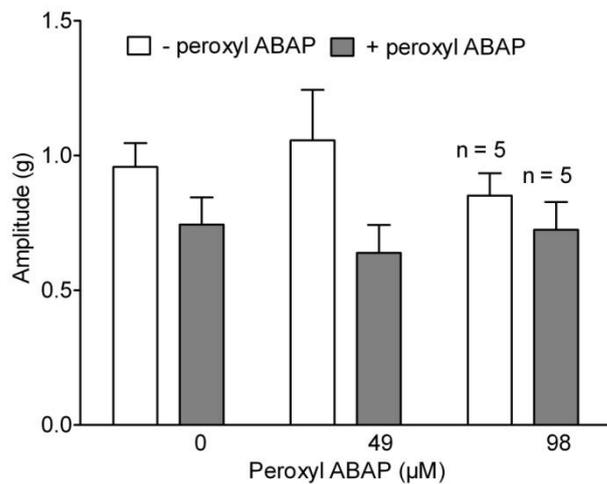


Figure 16. Effet du peroxy ABAP sur l'amplitude de la contraction phasique induite par le carbachol 1 μM. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 6 sauf indication).

Le traitement des bandelettes avec le t-BHP ne modifie pas leur réponse au carbachol 1 μM, l'amplitude de la contraction phasique en absence du t-BHP est de 1.24 ± 0.15 g (n = 5) et de 1.22 ± 0.14 g (n = 5, $P > 0.05$) en présence du t-BHP 1 mM.

4.2. Contraction induite par la stimulation électrique

La stimulation électrique (EFS) est réalisée en faisant passer un courant électrique de 30 V (20 Hz, durée 0.5 msec/ impulsion). Les bandelettes sont stabilisées dans ces conditions pendant 30 min. La stimulation par champs électrique des bandelettes longitudinales de l'iléon se traduit par une contraction monophasique régulière (Fig. 17). Le tonus de repos des contractions est légèrement diminué, alors que l'amplitude des contractions est augmentée (Fig. 17).

La stimulation électrique ne modifie pas le tonus de repos des contractions (basal: 0.25 ± 0.06 g, n = 5; EFS: 0.24 ± 0.03 g, n = 5, $P > 0.05$; Fig. 18A). Par contre, elle induit une augmentation significative de l'amplitude à 1.00 ± 0.12 g (basal: 0.50 ± 0.12 , n = 5, $P \leq 0.05$; Fig. 18B). Après l'addition du peroxy ABAP 98 μM, une légère diminution est notée dans le tonus et l'amplitude des contractions induites par EFS mais de manière non significative ($P > 0.05$; Fig. 18 A-B); alors que la fréquence est inchangée ($P > 0.05$; Fig. 18 C).

En présence de peroxy ABAP, le tonus de repos des contractions en absence de EFS est légèrement diminué par rapport au tonus de repos sous EFS ($P > 0.05$; Fig. 18A). L'amplitude et la fréquence des contractions en présence de l'ABAP sous EFS n'est pas différente de celle de l'ABAP seul ($P > 0.05$; Fig. 18B-C). La relaxation induite par le peroxy ABAP sous EFS n'est pas significative bien qu'elle atteigne $31.4 \pm 13.1\%$ (n = 5, $P > 0.05$) et $40.0 \pm 15.9\%$ (n = 5, $P > 0.05$) respectivement à la cinquième et à la dernière minute d'incubation. La durée du silence induite par l'application du peroxy ABAP est diminuée de 149 ± 38 s (n = 5) à 56 ± 24 s (n = 5, $P \leq 0.05$).

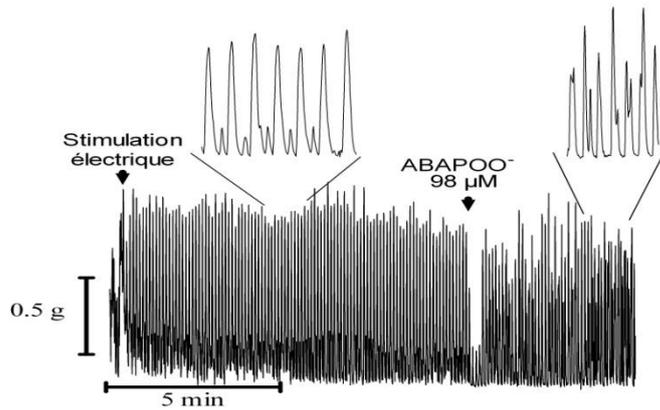


Figure 17. Enregistrement typique de l'effet du peroxy ABAP (ABAPOO) sur la contraction induite par la stimulation électrique.

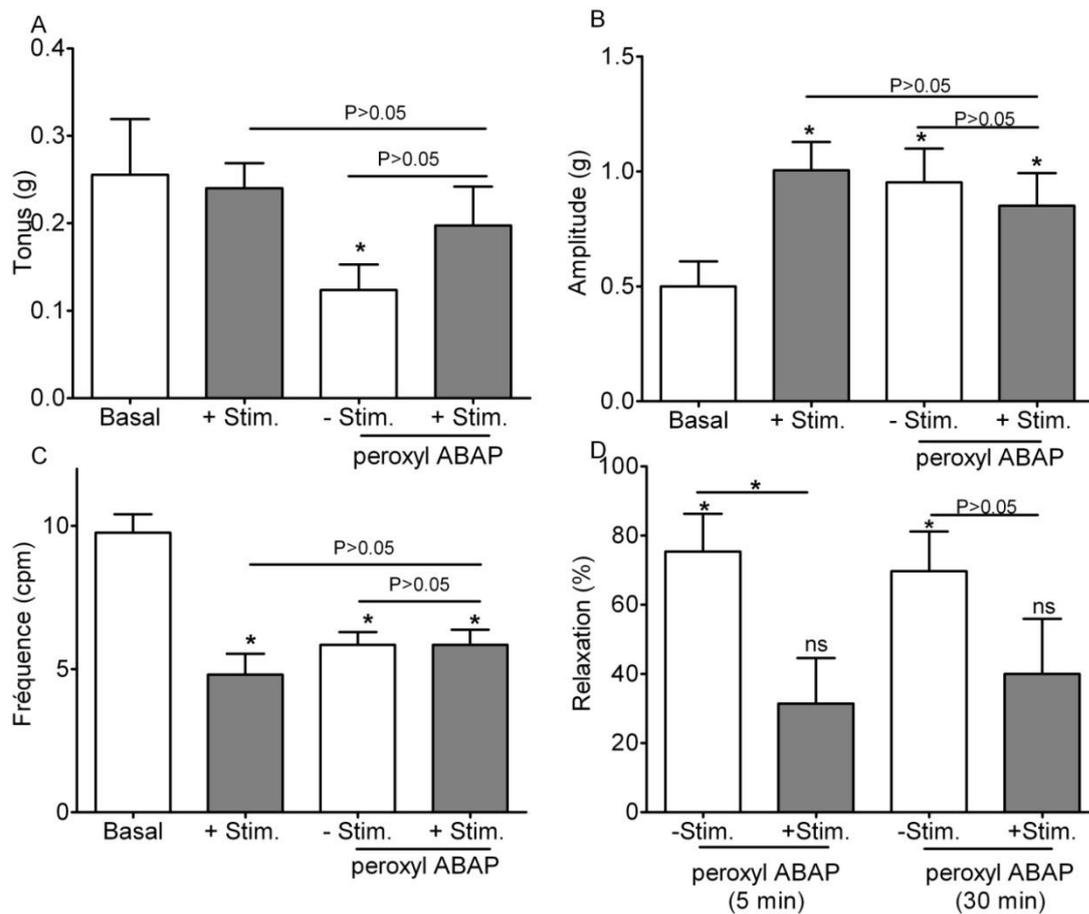


Figure 18. Effets du peroxy ABAP 98 μ M sur la contraction induite par la stimulation électrique. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5). * $P \leq 0.05$: comparaison par rapport au basal sauf indication et par rapport à 0% dans le cas de la relaxation. Stim. : Stimulation électrique, ns: non significatif.

4.3. Contraction induite par le KCl et le BaCl₂

L'incubation des bandelettes avec le KCl 80 mM ou le BaCl₂ 5 mM induit une contraction biphasique : une contraction phasique et une contraction tonique soutenue séparées par une petite relaxation de courte durée (Fig. 19).

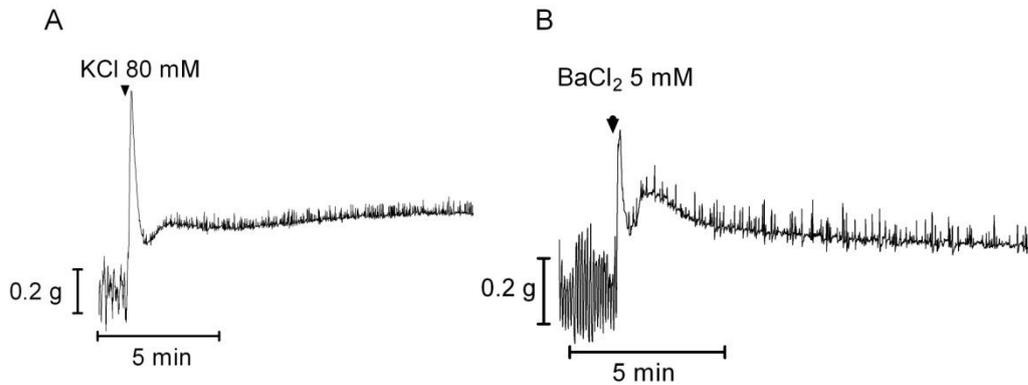


Figure 19. Enregistrements typiques de la contraction induite par le KCl et le BaCl₂.

L'addition du KCl ou du BaCl₂ induit une contraction phasique et une contraction tonique soutenue séparées par une petite relaxation de courte durée.

Le KCl augmente l'amplitude de la contraction phasique de 0.36 ± 0.04 g ($n = 13$) à 1.10 ± 0.11 g ($n = 13$, $P \leq 0.05$; Fig. 20A). Le tonus (ou contraction tonique) est augmenté de 0.35 ± 0.03 g ($n = 13$) à 0.72 ± 0.02 g ($n = 13$, $P \leq 0.05$; Fig. 20B). L'élimination du KCl (plusieurs lavages suivis d'une période de stabilisation de 30 min) ne permet pas le retour du tissu à son activité basal. En comparaison avec l'état basal, le tonus est légèrement augmenté (0.41 ± 0.02 g, $n = 13$, $P > 0.05$); l'amplitude et la fréquence sont diminuées après le traitement avec le KCl (amplitude : 0.23 ± 0.02 g, $n = 13$, $P \leq 0.05$; fréquence : 5.6 ± 0.7 cpm, $n = 13$, $P \leq 0.05$).

Le BaCl₂ augmente l'amplitude de la contraction phasique de 0.43 ± 0.05 g ($n = 13$) à 1.08 ± 0.12 g ($n = 13$, $P \leq 0.05$; Fig. 20A). La force atteinte par la contraction tonique est de 0.59 ± 0.02 g ($n = 13$, $P \leq 0.05$; basal: 0.33 ± 0.03 g, $n = 13$; Fig. 20B). L'élimination du BaCl₂, comme décrit pour le KCl, ne permet pas le retour du tissu à son activité basal. En comparaison avec l'état basal, le tonus est légèrement augmenté (0.39 ± 0.03 g, $n = 13$, $P > 0.05$), l'amplitude passe à 0.30 ± 0.03 g ($n = 13$, $P \leq 0.05$) et la fréquence à 2.5 ± 0.7 cpm ($n = 13$, $P \leq 0.05$).

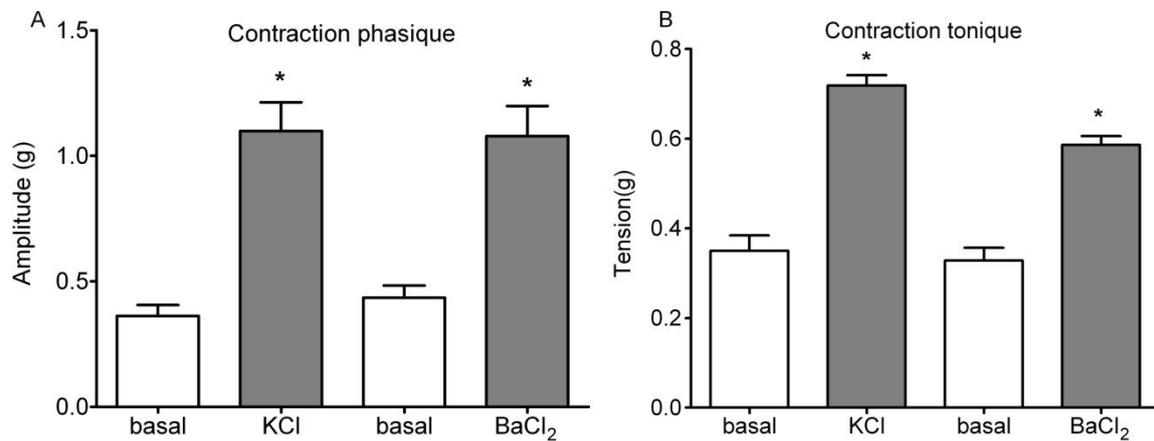


Figure 20. Amplitude et tension de la contraction induite par le KCl 80 mM et le BaCl₂ 5 mM. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 13). *P \leq 0.05; comparaison par rapport au basal.

- Effet du t-BHP

Le prétraitement des bandelettes avec le t-BHP 1 mM n'a aucun effet sur la contraction phasique induite par le KCl ou le BaCl₂. Par contre, la contraction tonique diminue progressivement avec le temps (Fig. 21A, B). L'amplitude de la contraction phasique est de 1.04 ± 0.06 et 0.87 ± 0.10 g (n = 6; KCl : 0.89 ± 0.10 g, n = 6, P>0.05; BaCl₂ : 0.85 ± 0.11 g, n = 6, P>0.05; Fig. 22A) pour les tissus traités respectivement avec le KCl et le BaCl₂. La tension de la contraction tonique est diminuée de manière significative (P \leq 0.05; Fig. 22B); les taux de diminution sont de 44.1% (n = 6) et de 38.3% (n = 6) pour les tissus traités respectivement avec le KCl 80 mM et le BaCl₂ 5 mM.

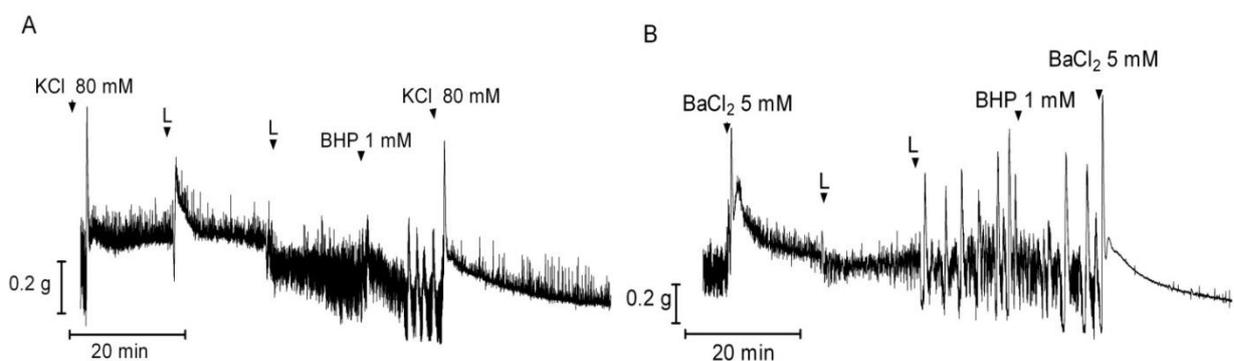


Figure 21. Enregistrements typiques de l'effet du BHP sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂.

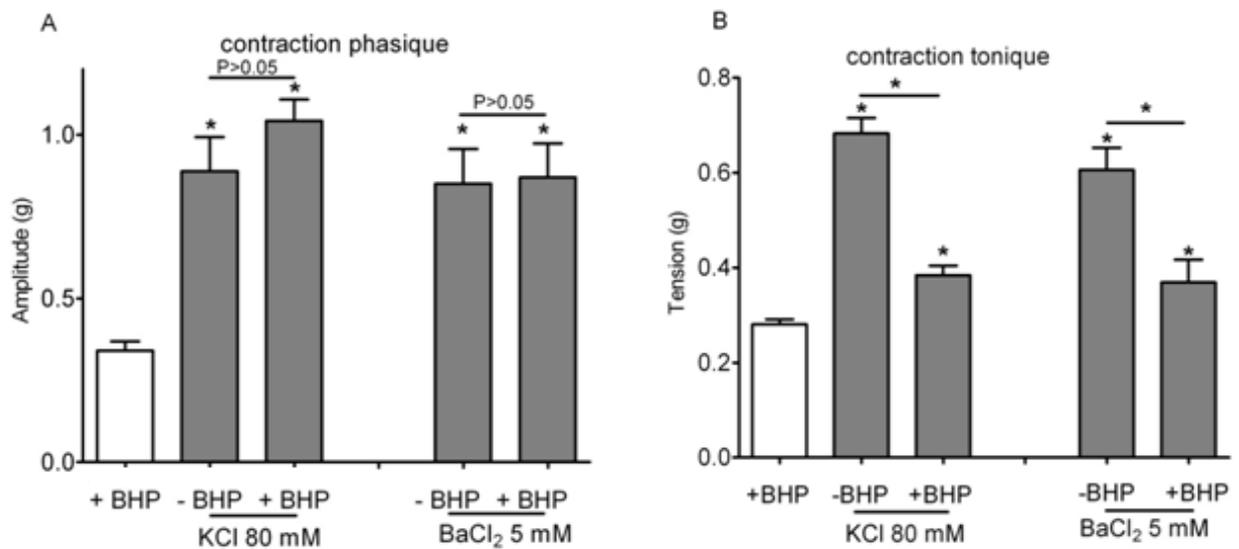


Figure 22. Effet du BHP 1 mM sur l'amplitude de la contraction phasique et la contraction tonique induites par le KCl ou le BaCl₂.

Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6). *P \leq 0.05, comparaison BHP + KCl/BaCl₂ vs. BHP.

- Effets de l'ABAP

Dans cette expérience, l'ABAP 20 et 40 mM sont incubés pendant 60 min avant leur addition au milieu d'incubation, ce qui est équivalent à l'obtention d'une concentration de peroxy ABAP de 98 et de 196 μ M, respectivement. Etant donné que KCl et le BaCl₂ sont ajoutés au milieu d'incubation 15 ou 20 minutes après l'addition du peroxy ABAP 98 ou 196 μ M, ceci correspond à une concentration de 122.4 et 261.1 μ M de peroxy ABAP au moment de l'enregistrement des effets de l'addition du KCl ou du BaCl₂.

Les effets de l'ABAP sur la contraction phasique et la contraction tonique des bandelettes longitudinales induites par le KCl ou le BaCl₂ ne semblent pas dépendre de la concentration (Fig. 23). Après l'incubation des bandelettes avec le peroxy ABAP 98 ou 196 μ M, l'application du KCl ou du BaCl₂ induit le même type de réponse observée en absence de peroxy ABAP: une contraction phasique et une contraction tonique séparées par une petite relaxation de courte durée (Fig. 23). En absence de peroxy ABAP, les bandelettes répondent au KCl 80 mM par une contraction phasique de 1.10 ± 0.11 g (n = 13; Fig. 24A), alors que la tension de la contraction tonique est de 0.72 ± 0.02 g (n = 13; Fig. 24B). L'amplitude de la contraction phasique induite par le KCl en présence de peroxy ABAP 98 μ M est de 0.97 ± 0.17 g (n = 6, P > 0.05; Fig. 24A); la tension de la contraction tonique est augmentée de 18.5% (n = 6, P \leq 0.05; Fig. 24B). L'amplitude de la contraction phasique induite par le KCl est augmentée à 1.48 ± 0.18 g (n = 7, P < 0.05) pour les tissus traités avec le peroxy ABAP 196 μ M, mais la tension de la contraction tonique reste inchangée (P > 0.05; Fig. 24B).

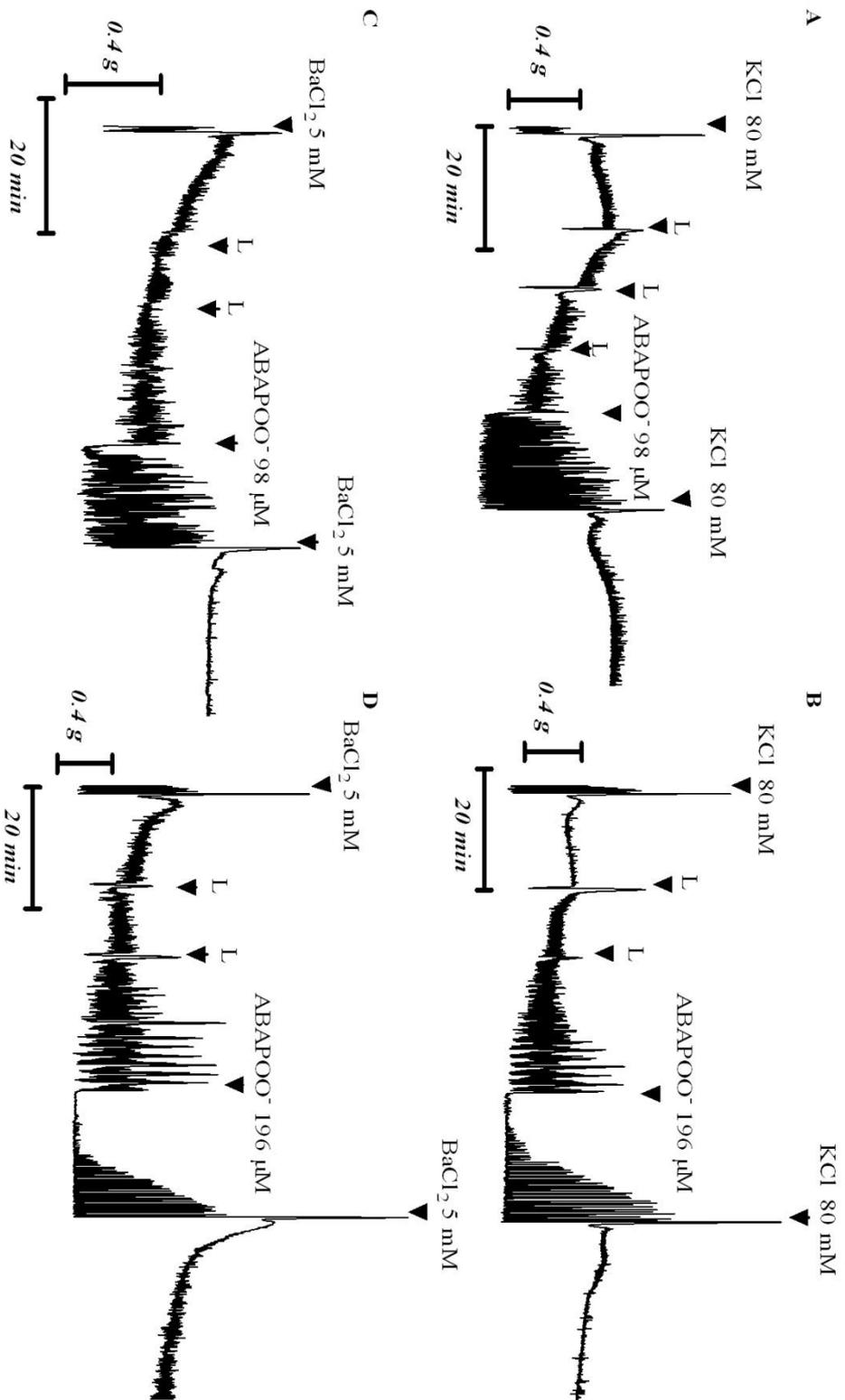


Figure 23. Enregistrements typiques de l'effet de peroxy ABAP (ABAPOO[•]) 98 et 196 μM sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂.

La comparaison des réponses au KCl en présence des deux concentrations de peroxy ABAP montre une augmentation significative de 34.4% dans l'amplitude de la contraction phasique ($P \leq 0.05$; Fig. 24A). Par contre, une faible différence (13.5%) est notée entre les tensions de la contraction tonique ($P > 0.05$; Fig. 24B).

Les bandelettes répondent au BaCl_2 5 mM seul par une contraction phasique (1.07 ± 0.11 g, $n = 12$; Fig. 24A) et une contraction tonique de 0.52 ± 0.02 g ($n = 12$; Fig. 24B). Le traitement des bandelettes avec le peroxy ABAP 98 μM ne modifie pas l'amplitude de la contraction phasique induite par le BaCl_2 ($P > 0.05$; Fig. 24A), alors que la tension de la contraction tonique est augmentée de 22.0% ($P \leq 0.05$; Fig. 24B). En présence de peroxy ABAP 196 μM , l'amplitude de la contraction phasique est augmentée à 1.75 ± 0.3 g ($n = 7$, $P \leq 0.05$; Fig. 24A) et la tension de la contraction tonique est augmentée de 28.0% ($P \leq 0.05$; Fig. 24B).

La comparaison des réponses au BaCl_2 en présence des deux concentrations du peroxy ABAP montre une différence de 49.0% ($P \leq 0.05$, Fig. 24A) entre les amplitudes de la contraction phasique. La contraction tonique est peu affectée par l'augmentation de la concentration du peroxy ABAP (7.8%, $P > 0.05$; Fig. 24B).

- Effet de la combinaison peroxy ABAP / vérapamil

L'addition du vérapamil 1 μM induit un arrêt total des contractions spontanées et une diminution du tonus de repos (relaxation totale) dans les minutes qui suivent son application (Fig. 25A-D). Seul le peroxy ABAP 196 μM est capable d'induire une reprise modérée des contractions spontanées en présence du vérapamil et une réponse à l'addition du KCl ou du BaCl_2 (Fig. 25B-D). Le traitement des bandelettes avec le vérapamil 1 μM induit une diminution du tonus de repos de 0.39 ± 0.02 g ($n = 12$) à 0.21 ± 0.02 g ($n = 12$, $P \leq 0.05$; Fig. 26A).

Le peroxy ABAP 98 et 196 μM n'affectent pas la relaxation induite par le vérapamil (Fig. 26A). Les bandelettes traitées avec l'ABAP 196 μM et en présence du vérapamil 1 μM reprennent leur activité phasique après 7 à 8 minutes de silence (470 ± 48 s, $n = 7$), une durée qui n'est pas différente de celle observée avec l'ABAP seul (460 ± 45 s, $n = 7$). Dans ce cas, les contractions rythmiques se stabilisent à un tonus de repos de 0.16 ± 0.03 g ($n = 7$) qui n'est pas différent de celui observé avec le peroxy ABAP 196 μM . Malgré la reprise des contractions phasiques, l'amplitude et la fréquence des contractions restent significativement plus petites qu'en présence de l'ABAP seul ($P \leq 0.05$; Fig. 26B-C).

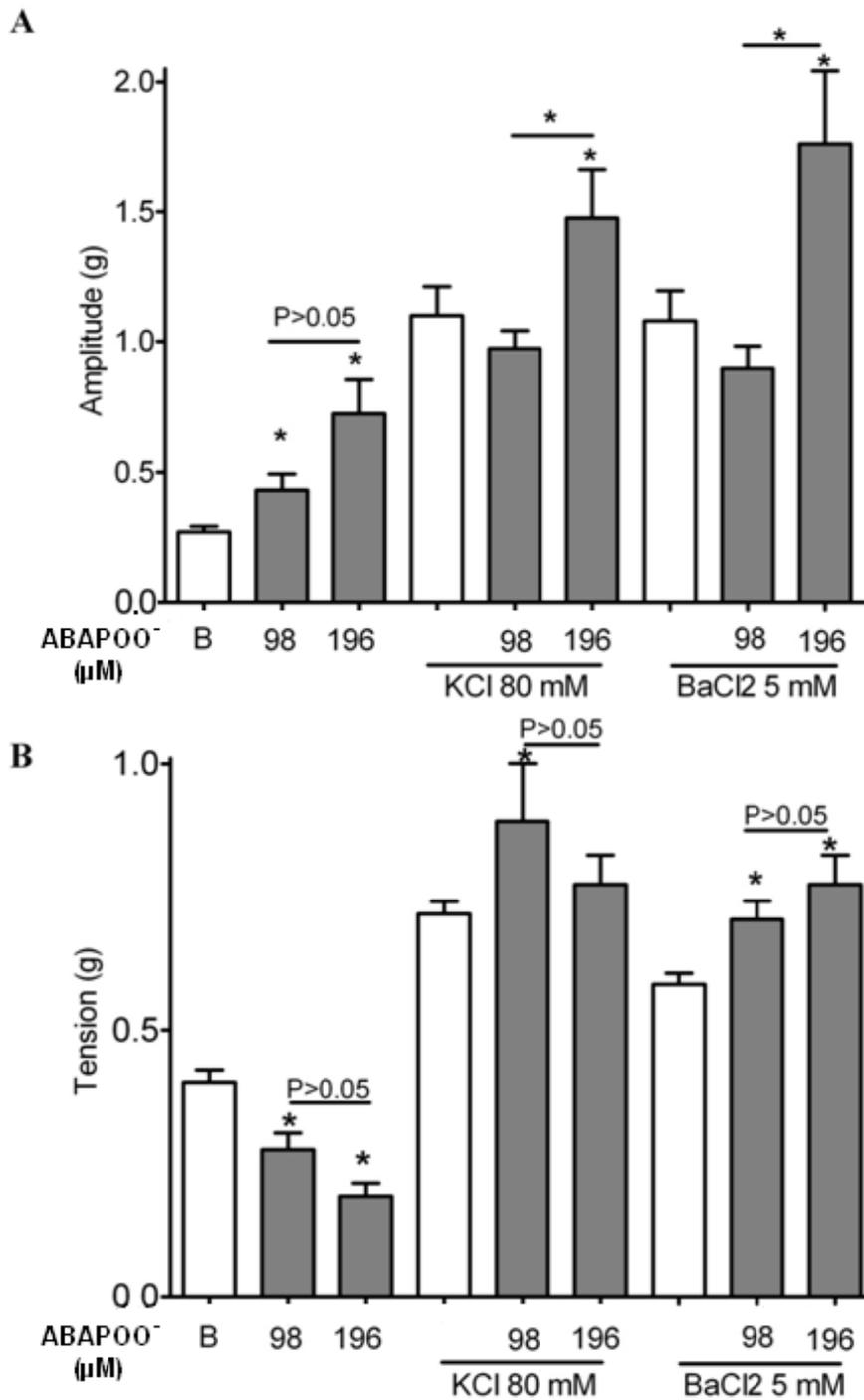


Figure 24. Effet du peroxy ABAP (ABAP OO^-) sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5-7). *P \leq 0.05: comparaison par rapport au témoin correspondant sauf indication. Le témoin est la moyenne des valeurs basales pour les bandelettes traitées avec le peroxy ABAP 98 et 196 μM (n = 13). B: basal.

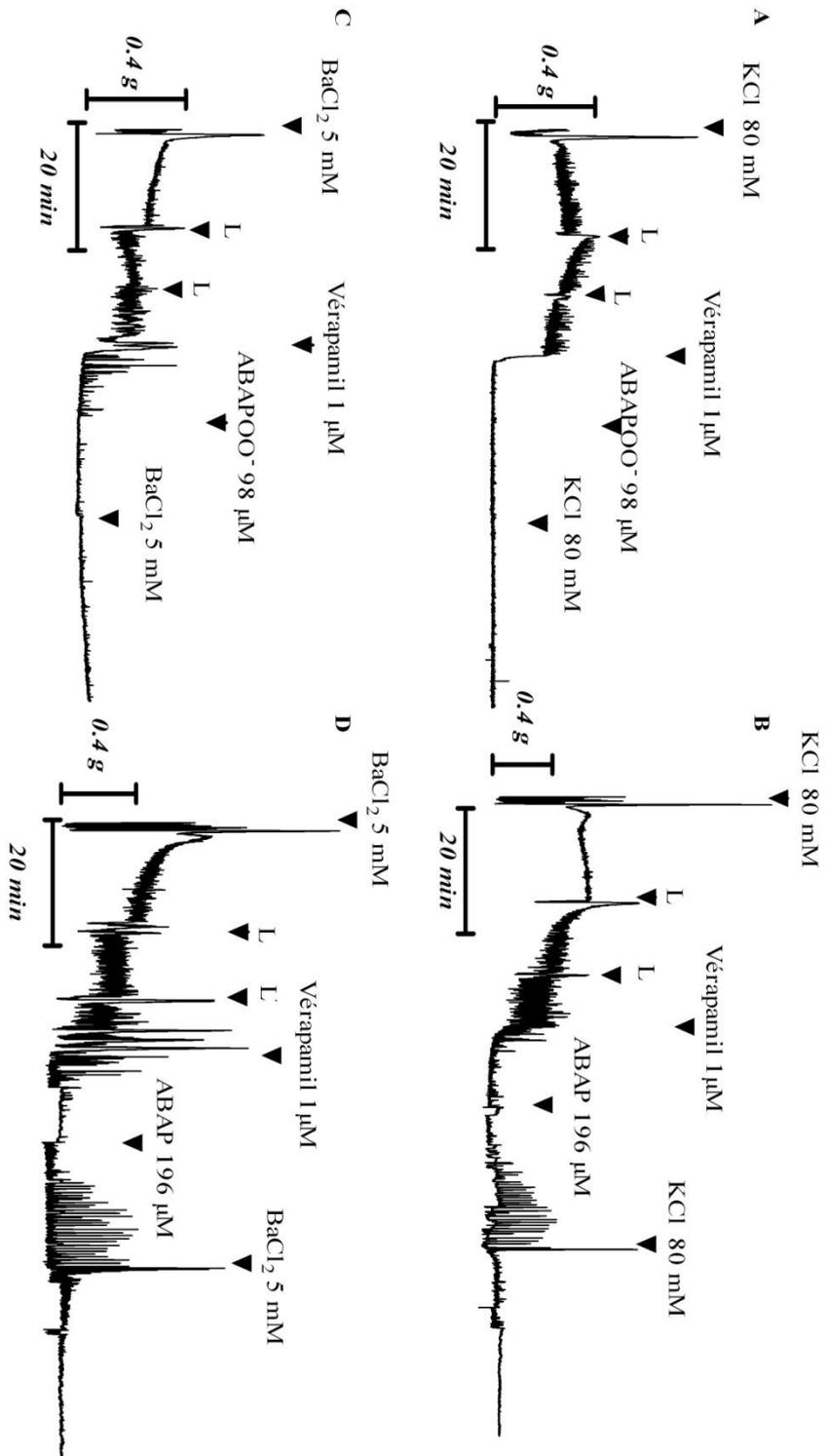


Figure 25. Enregistrements typiques de l'effet de peroxy ABAP (ABAPOO) sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂ en présence du vérapamil. L: Lavage.

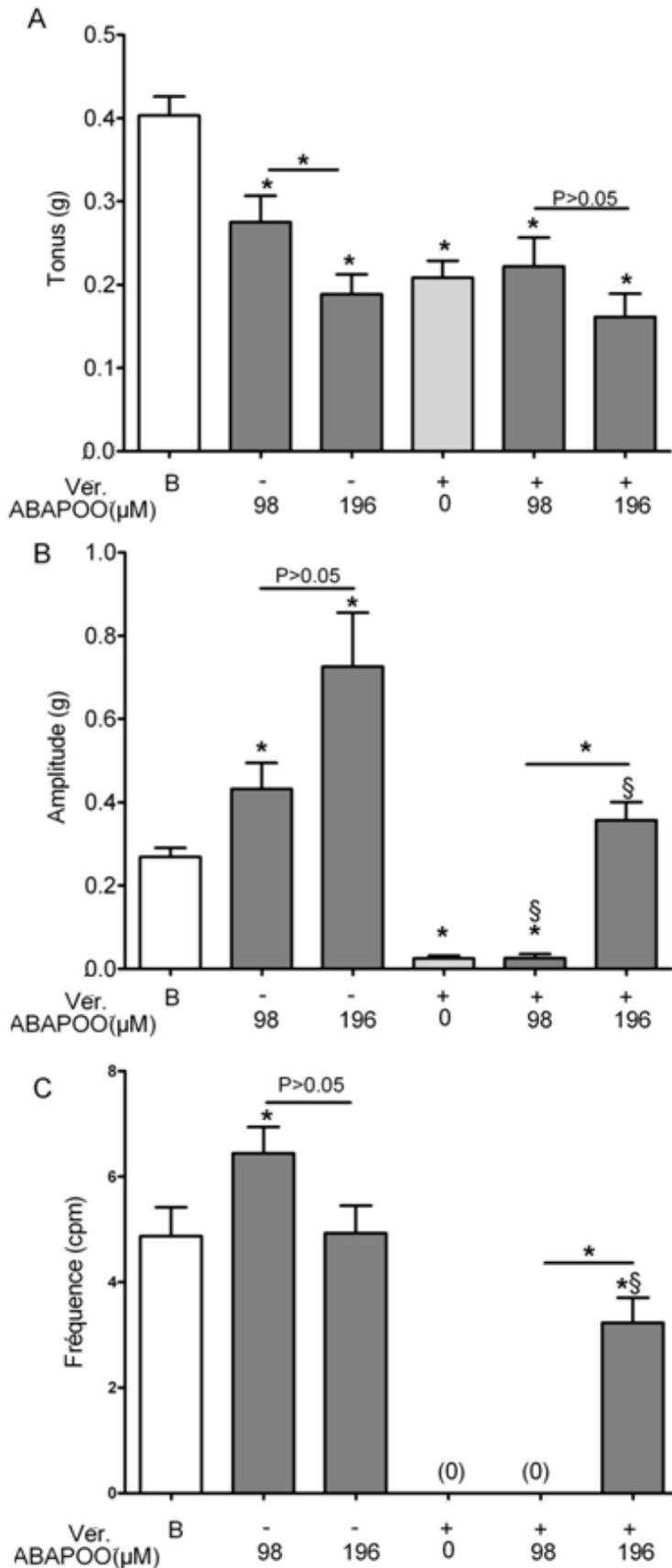


Figure 26. Effets du peroxy ABAP (ABAPOO) en absence et en présence du vérapamil (vér.) 1 μM sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin.

Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 5-7). *P≤0.05: comparaison par rapport au basal (B) sauf indication. § P≤0.05: comparaison Peroxyl ABAP (98/196) + vérapamil vs. peroxy ABAP (98/196). Le basal est la moyenne des valeurs basales des bandelettes traitées avec le peroxy ABAP 98 et 196 μM en absence et en présence du vérapamil (n = 13).

La contraction induite par le KCl et le BaCl₂ dépendent de la concentration du peroxy ABAP ajouté. En présence du vérapamil et du peroxy ABAP 98 µM, le KCl 80 mM ou le BaCl₂ 5 mM induisent une contraction phasique peu différente de zéro (Fig. 27A). En présence du vérapamil et du peroxy ABAP 196 µM, les agents de stimulation induisent une contraction phasique qui reste atténuée par rapport à celle induite par le KCl seul (Fig. 27A). La comparaison des deux concentrations de peroxy ABAP montre une différence significative dans l'amplitude de la contraction phasique induite par le KCl ou le BaCl₂ (P≤0.05; Fig. 27A).

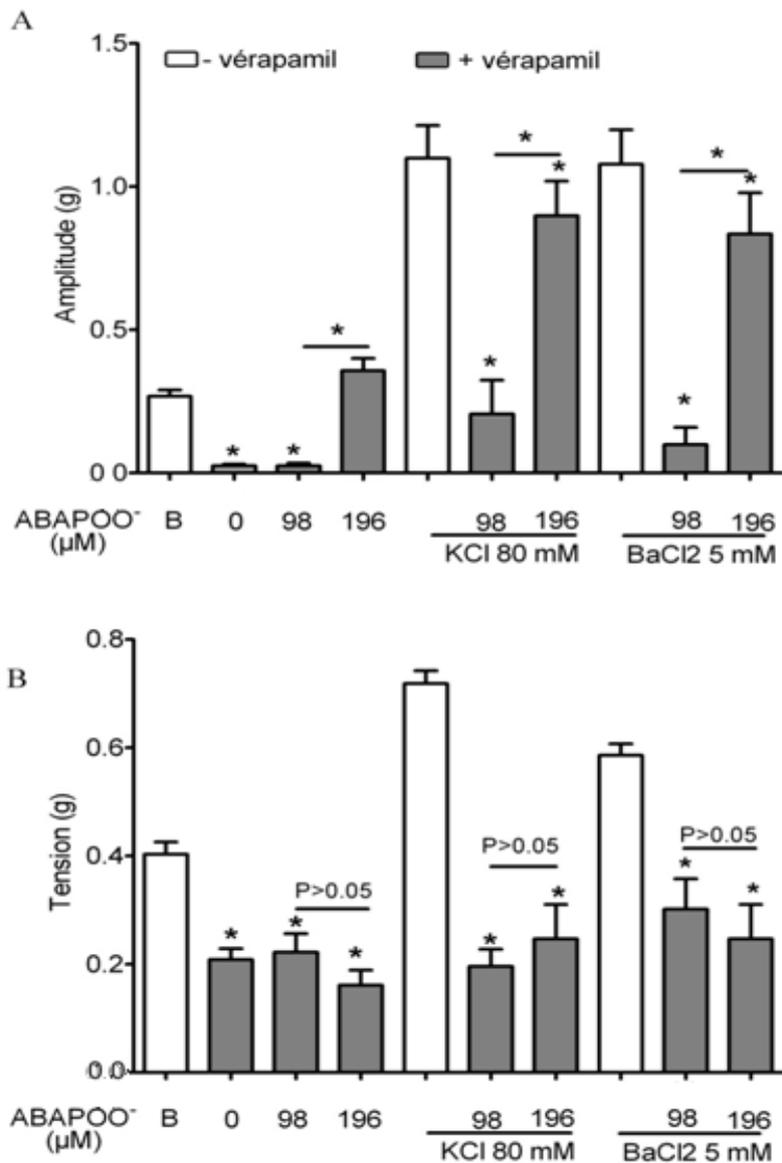


Figure 27. Effet du peroxy ABAP (ABAPOO⁻) en présence du vérapamil 1 µM sur la contraction induite par le KCl ou le BaCl₂. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 5-7). *P≤0.05: comparaison par rapport au témoin correspondant (peroxy ABAP 0/vérapamil 0) sauf indication. Le témoin est la moyenne des valeurs basales des bandelettes traitées avec le peroxy ABAP 98 et 196 µM (n = 13). B: basal.

5. Etude pharmacologique de la réponse du muscle lisse à l'ABAP

5.1. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse

L'hexaméthonium 100 μM , l'atropine 1 μM et la lidocaïne 100 μM sont ajoutées au milieu d'incubation pendant 15 minutes avant l'addition du peroxy ABAP 98 μM . L'observation des enregistrements des contractions ne révèle pas de modification du tonus, de l'amplitude et de la fréquence des contractions des tissus traités avec l'hexaméthonium 100 μM et l'atropine 1 μM (Fig. 28A, B). Dans ces deux cas, le rythme des contractions est maintenu, une stabilité est notée dans le tonus, l'amplitude et la fréquence des contractions. La lidocaïne induit une forte perturbation non reproductible des contractions phasiques, caractérisée par une légère augmentation du tonus de repos et une diminution de l'amplitude des contractions sans modifier leur fréquence (Fig. 28C).

L'addition de l'hexaméthonium 100 μM ne modifie ni le tonus de repos ni l'amplitude ni la fréquence des contractions ($n = 5$, $P > 0.05$; Fig. 29A-C). En présence du peroxy ABAP 98 μM , le tonus est diminué à 0.16 ± 0.02 g ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 28A); alors que l'amplitude est augmentée de 39.1% ($P \leq 0.05$; Fig. 28B) et la fréquence diminuée de 9.4 ± 1.0 cpm ($n = 5$) à 6.0 ± 0.4 cpm ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 29C). Comparée à la réponse du peroxy ABAP en présence du véhicule, seule la durée du silence est diminuée de 119 ± 13 s ($n = 6$) à 50 ± 10 s ($n = 5$, $P \leq 0.05$) par l'hexaméthonium, le reste des paramètres de la contraction ne présentent pas de différences ($P > 0.05$; Fig. 29A-D).

Le traitement des bandelettes longitudinales avec l'atropine 1 μM induit une légère diminution du tonus de 0.33 ± 0.06 g ($n = 6$) à 0.29 ± 0.05 g ($n = 5$, $P > 0.05$). L'amplitude et la fréquence des contractions ne sont pas modifiées ($P > 0.05$; Fig. 29B-C). L'application du peroxy ABAP 98 μM diminue légèrement le tonus à 0.20 ± 0.03 g ($n = 5$, $P > 0.05$; Fig. 29A); alors que l'amplitude est faiblement augmentée à 0.85 ± 0.05 g ($n = 5$, $P > 0.05$; atropine: 0.59 ± 0.12 g, $n = 5$; Fig. 29B). La fréquence des contractions est diminuée de 9.3 ± 0.9 cpm à 6.9 ± 0.9 cpm ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 29C). Comparée à la réponse du peroxy ABAP en présence du véhicule, la durée du silence est réduite de 50.4% ($P \leq 0.05$) par l'atropine; le reste des paramètres de la contraction ne présentent pas de différences ($P > 0.05$; Fig. 29A-D).

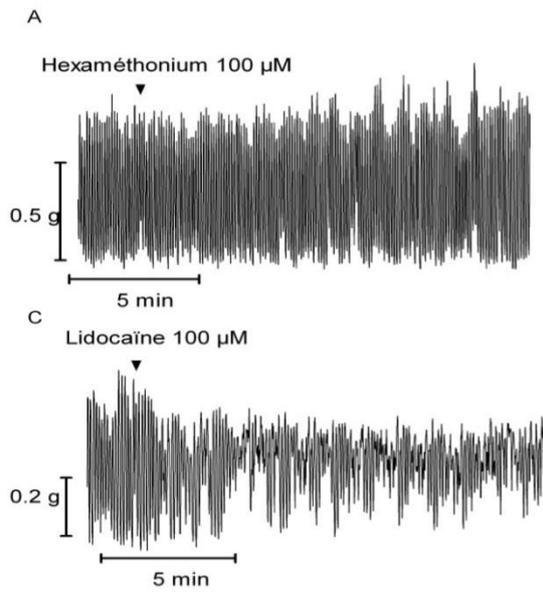


Figure 28. Enregistrements typiques de l'effet de l'hexaméthonium, de l'atropine et de la lidocaïne sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin.

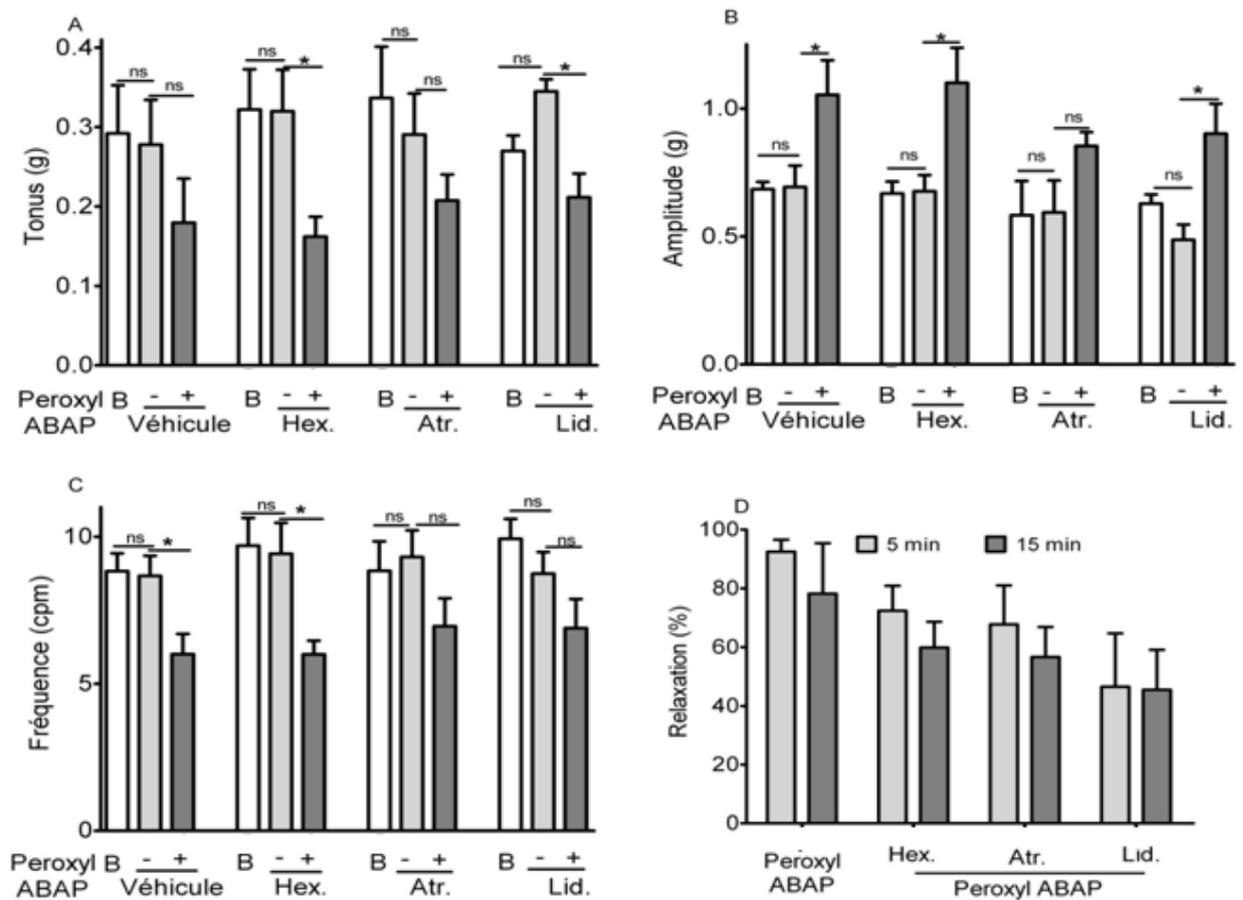


Figure 29. Influence de l'hexaméthonium (Hex.) 100 µM, de l'atropine (Atr.) 1 µM et de la lidocaïne (Lid.) 100 µM sur la réponse des bandelettes de l'iléon de lapin au peroxy ABAP 98 µM. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 5-6). *P<0.05: comparaison par rapport au basal (B) sauf indication; ns : non significatif.

La lidocaïne 100 μM induit une légère augmentation du tonus à 0.34 ± 0.01 g ($n = 6$, basal: 0.27 ± 0.02 g, $n = 6$, $P > 0.05$; Fig. 29A). Parallèlement, l'amplitude et la fréquence des contractions sont légèrement diminuées respectivement à 0.48 ± 0.06 g ($n = 6$, basal: 0.62 ± 0.04 g, $n = 6$, $P > 0.05$; Fig. 29B) et à 8.7 ± 0.7 cpm ($n = 6$, $P > 0.05$; basal: 9.9 ± 0.6 cpm, $n = 6$; Fig. 28B). En présence du peroxy ABAP 98 μM , le tonus est diminué à 0.21 ± 0.03 g ($n = 5$, $P \leq 0.05$) et l'amplitude augmentée de 46.6% ($P \leq 0.05$; Fig. 29B). Par contre, l'application du peroxy ABAP induit une légère diminution de la fréquence ($P > 0.05$; Fig. 29C). Comparée à la réponse du peroxy ABAP en présence du véhicule, le traitement des bandelettes avec la lidocaïne induit une diminution significative de la durée du silence à 68 ± 14 s ($n = 6$, $P \leq 0.05$), le reste des paramètres de la contraction ne présentent pas de différences ($P > 0.05$; Fig. 29A-D).

5.2. Effet de l'isoprotérénol

L'isoprotérénol 100 μM est ajouté au milieu d'incubation pendant 15 minutes avant l'addition de peroxy ABAP 98 μM . L'isoprotérénol induit un arrêt total des contractions phasiques (Fig. 30A) et cela généralement après 5 min d'incubation. Dans ce cas, il induit une relaxation totale du muscle lisse (isoprotérénol: 0.05 ± 0.01 g, $n = 6$, $P \leq 0.05$; basal: 0.25 ± 0.02 g, $n = 5$; Fig. 30B). Les bandelettes traitées avec l'isoprotérénol ne répondent pas au peroxy ABAP et le tonus reste inchangé par rapport à celui noté en présence de l'isoprotérénol seul (0.04 ± 0.01 g, $n = 6$, $P > 0.05$; Fig. 30B).

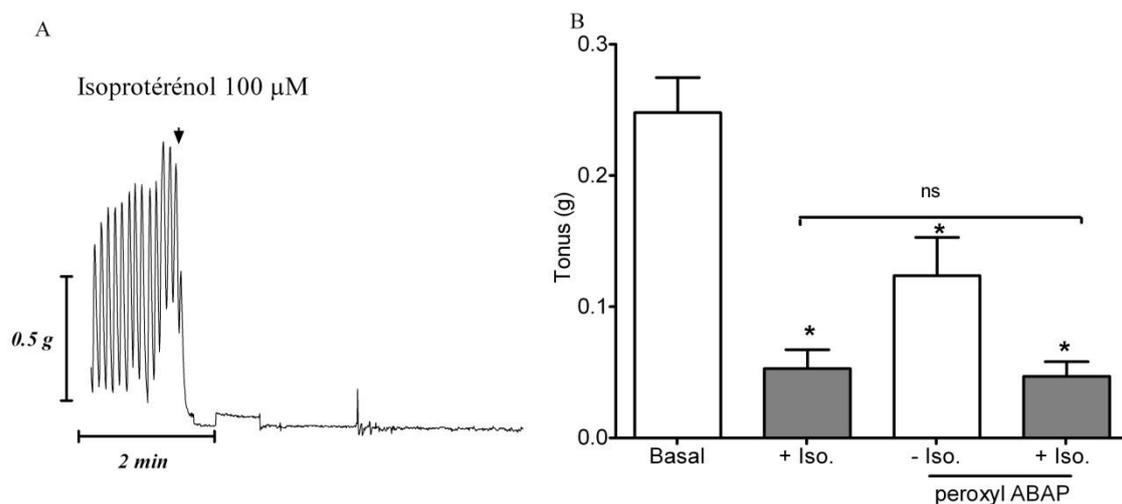


Figure 30. A: Enregistrement typique de l'effet de l'isoprotérénol sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. **B:** Influence de l'isoprotérénol 100 μM (Iso.) sur le tonus des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 6$). * $P \leq 0.05$: comparaison par rapport au basal. ns : non significatif.

5.3. Effets des antagonistes des canaux potassiques

La 4-AP 4 mM, le TEA 5 mM et le clotrimazole 30 μ M sont ajoutés au milieu d'incubation pendant 20 min avant l'addition du peroxy ABAP 98 μ M. L'observation des enregistrements des contractions révèle que l'addition du DMSO (véhicule) au milieu d'incubation n'a pas d'effet sur la contraction spontanée des bandelettes (Fig. 31A). La 4-AP induit l'apparition d'un pic de contraction transitoire suivi par des contractions phasiques de tonus élevé et de faible amplitude (Fig. 31B). Quelques fois, la 4-AP induit des contractions phasiques très irrégulières de grande amplitude et de tonus de repos relativement bas (Fig. 31C). Comme la 4-AP, le TEA induit un pic de contraction phasique (rapide et transitoire), augmente le tonus et diminue l'amplitude et la fréquence des contractions (Fig. 31D). Dans le cas du clotrimazole, le tonus est inchangé; par contre, l'amplitude et la fréquence des contractions diminuent progressivement au cours du temps (Fig. 31E).

L'application de la 4-AP augmente significativement le tonus de repos des contractions de 0.21 ± 0.03 g (n = 5) à 0.42 ± 0.04 g (n = 5, $P \leq 0.05$; Fig. 32A), l'amplitude est diminuée de 16% mais de manière non significative ($P > 0.05$; Fig. 32B). Par contre, la fréquence des contractions est significativement diminuée ($P \leq 0.05$; Fig. 32C). En présence de peroxy ABAP 98 μ M, une diminution significative du tonus est notée (0.23 ± 0.03 g, n = 5, $P \leq 0.05$), l'amplitude est augmentée à 0.91 ± 0.07 g (n = 5, $P \leq 0.05$). Dans ces conditions, le vérapamil 1 μ M induit une diminution non significative du tonus (0.14 ± 0.03 g, n = 5, $P > 0.05$; Fig. 32A). Par contre, l'amplitude et la fréquence des contractions sont fortement réduites aux cours des dernières minutes d'incubation avec le vérapamil ($P \leq 0.05$; Fig. 32B-C). Les bandelettes traitées avec la 4-AP et en présence du (peroxy ABAP \pm vérapamil) présentent un tonus de repos des contractions élevé par rapport à leur témoin correspondant ($P \leq 0.05$; Fig. 32A). Pour ce même type de comparaison, aucune différence n'est notée dans l'amplitude, la fréquence des contractions ou dans la relaxation induite par le peroxy ABAP ($P > 0.05$; Fig. 32A-C, Fig. 33). Le prétraitement avec la 4-AP réduit significativement la durée du silence induit par le peroxy ABAP de 110 ± 8 s à 44 ± 24 s (n = 5, $P \leq 0.05$).

Le traitement des bandelettes avec le TEA induit une augmentation significative du tonus à 0.51 ± 0.01 g (n = 5, $P \leq 0.05$; basal: 0.28 ± 0.07 g, n = 5) et une diminution de 32.2% dans l'amplitude des contractions phasiques ($P \leq 0.05$; basal: 0.62 ± 0.08 g, n = 6; Fig. 32B). Cependant, une diminution non significative de la fréquence des contractions est notée ($P > 0.05$; Fig. 32C). En présence du TEA, le peroxy ABAP 98 μ M diminue le tonus de 41.2% (n = 5, $P \leq 0.05$; Fig. 32A); mais il augmente l'amplitude des contractions de 59.2% ($P \leq 0.05$; Fig. 32B). L'addition du vérapamil induit une diminution significative du tonus, de l'amplitude et de la

fréquence des contractions, respectivement de 53.3, 76.7 et 64.4% ($P \leq 0.05$; Fig. 32A-C). Les bandelettes traitées avec le TEA et en présence du (peroxyl ABAP \pm vérapamil) présentent un tonus de repos des contractions élevé par rapport à leurs témoins correspondants ($P \leq 0.05$; Fig. 32A). Pour ce même type de comparaison, aucune différence n'est notée dans l'amplitude, la fréquence des contractions ou la relaxation induite par le peroxyl ABAP ($P > 0.05$; Fig. 32A-C). Le TEA n'a pas d'effet significatif sur la durée du silence (TEA: 84 ± 10 s, $n = 5$, $P > 0.05$).

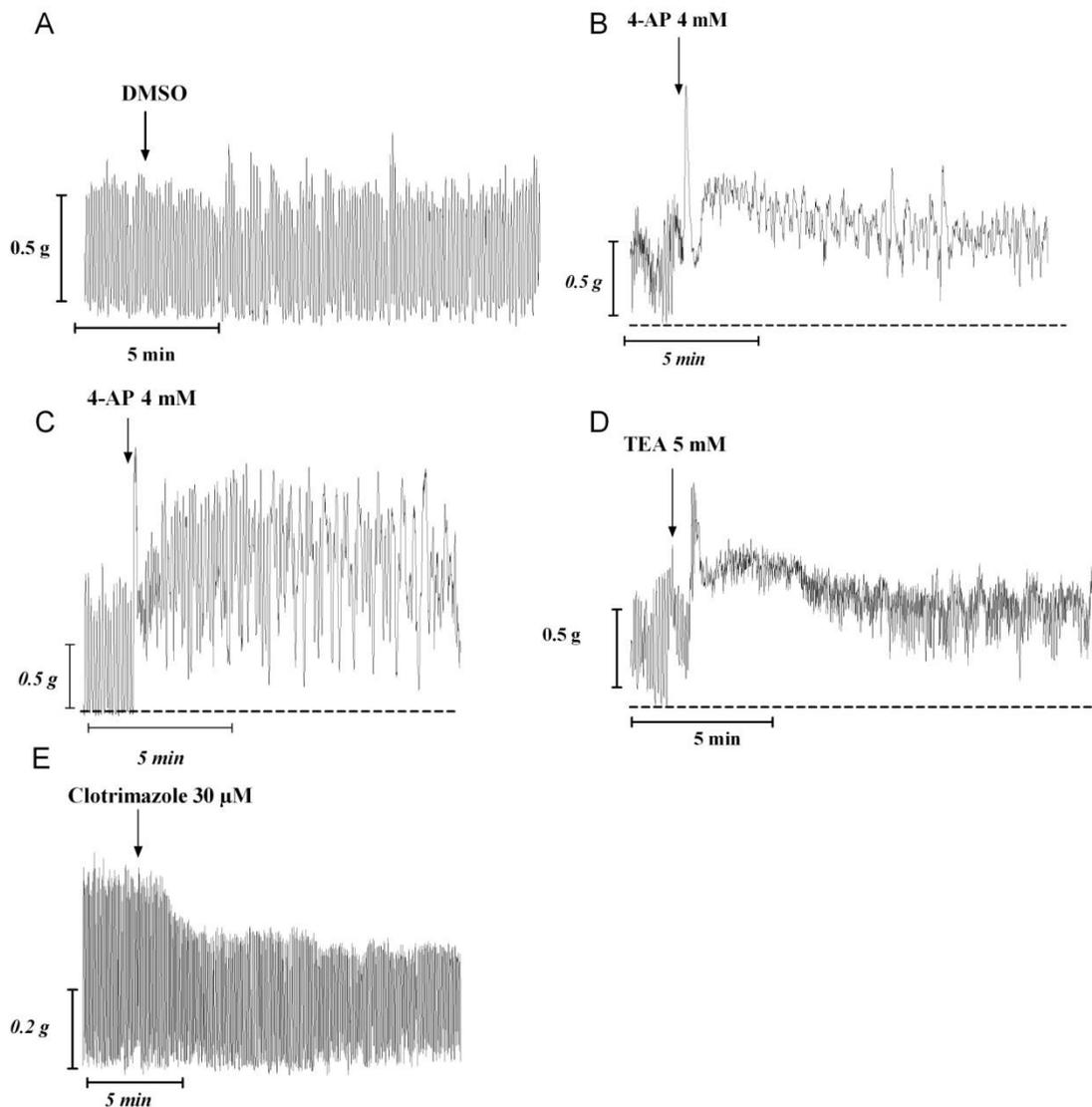


Figure 31. Enregistrements typiques de l'effet du DMSO (véhicule), de la 4-AP, du TEA et du clotrimazole sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. La ligne discontinue représente le niveau du tonus basal des contractions phasiques.

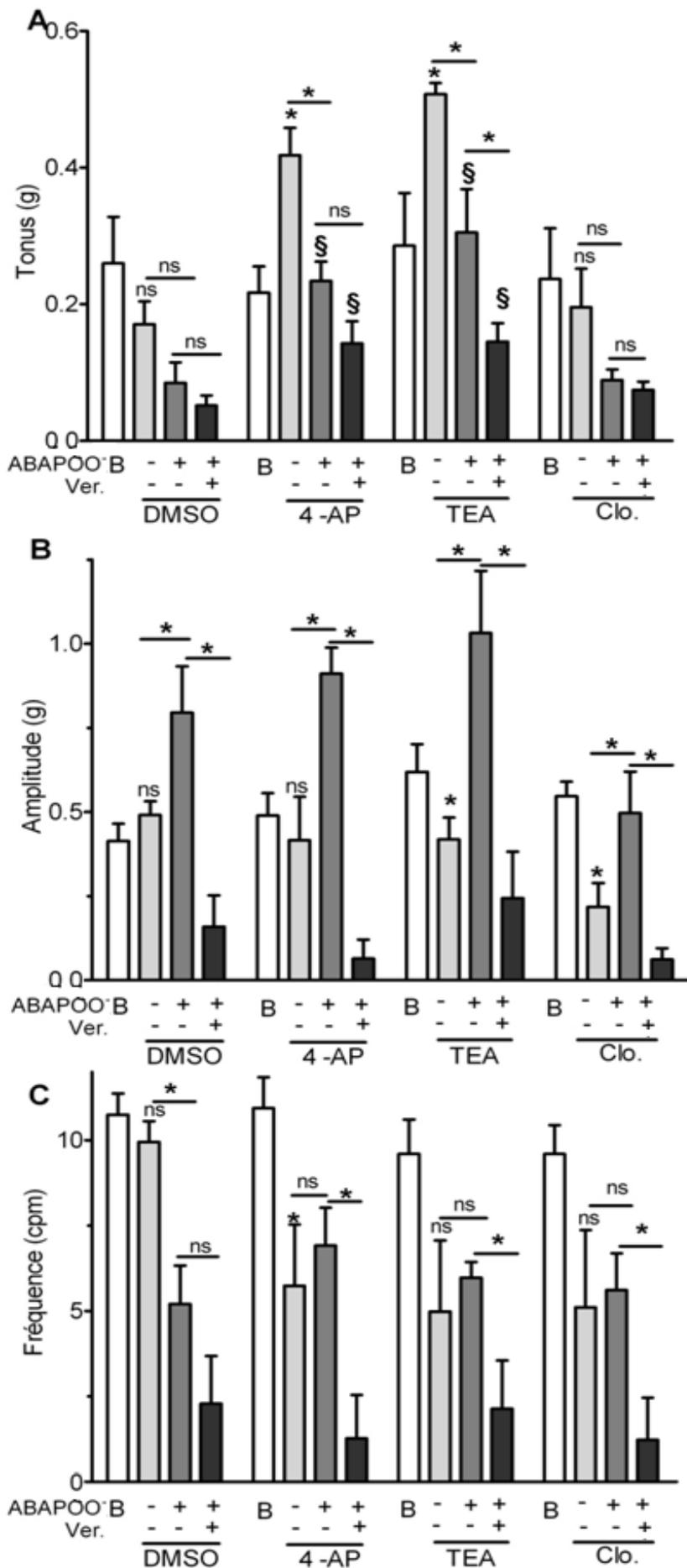


Figure 32. Influence de la 4-AP 4 mM, le TEA 5 mM et le clotrimazole (Clo.) 30 µM sur la réponse des bandelettes longitudinales au peroxy ABAP (ABAPOO) 98 µM et au vérapamil (Ver.) 1µM. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 5). *P≤0.05: comparaison par rapport au basal (B) sauf indication. §P≤0.05: comparaison par rapport aux témoins correspondants. ns: non significatif.

L'activité rythmique des bandelettes traitées avec le clotrimazole est caractérisée par une faible diminution du tonus ($P > 0.05$; Fig. 32A). Par contre, l'amplitude des contractions est diminuée de manière significative de 0.54 ± 0.04 g ($n = 5$) à 0.22 ± 0.07 g ($n = 5$, $P \leq 0.05$; Fig. 32B). La fréquence est légèrement diminuée à 5.1 ± 2.2 cpm ($n = 5$, $P > 0.05$). En présence du peroxy ABAP $98 \mu\text{M}$, une légère diminution du tonus est notée ($P > 0.05$), l'amplitude des contractions est faiblement augmentée à 0.49 ± 0.12 g ($n = 5$, $P > 0.05$; Fig. 32B). Cependant, la fréquence reste inchangée ($P > 0.05$). L'addition du vérapamil au mélange clotrimazole/ peroxy ABAP ne modifie pas le tonus de repos des contractions ($P > 0.05$) et abolit les contractions phasiques au cours des dernières minutes de l'incubation ($P \leq 0.05$; Fig. 32B-C). Les bandelettes traitées avec le clotrimazole et en présence du peroxy ABAP ou de la combinaison ABAP/vérapamil ne présentent aucune différence dans le tonus, l'amplitude, la fréquence des contractions ou la relaxation par rapport à leurs témoins correspondants ($P > 0.05$; Fig. 32A-C, Fig. 33). Le prétraitement avec le clotrimazole réduit la durée du silence induit par le peroxy ABAP à 35 ± 21 ($n = 5$, $P \leq 0.05$).

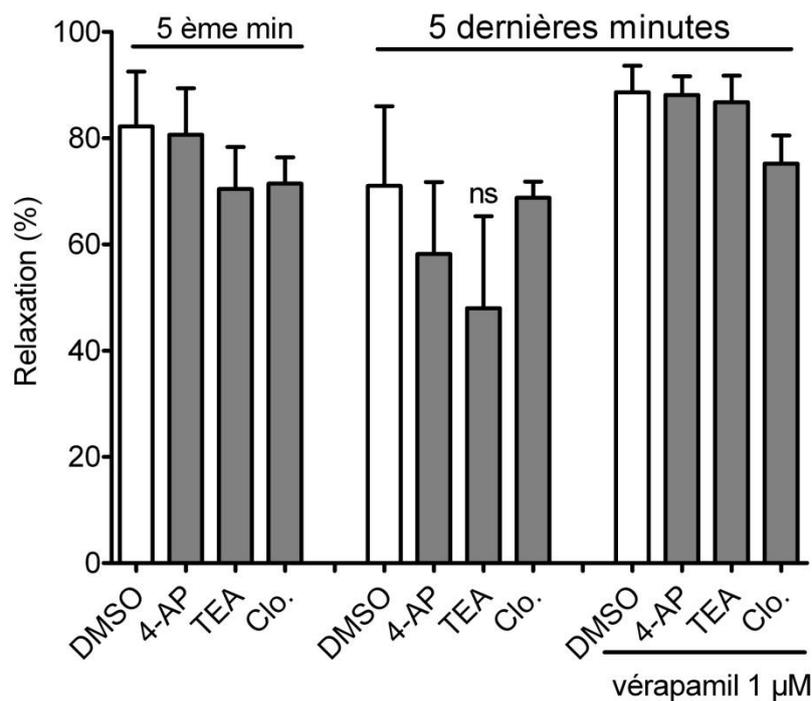


Figure 33. Effets de la 4-AP 4 mM, le TEA 5 mM et le clotrimazole (Clo.) $30 \mu\text{M}$ sur la relaxation induite par le peroxy ABAP $98 \mu\text{M}$ \pm vérapamil exprimée en pourcent par rapport à la relaxation induite par la papavérine $100 \mu\text{M}$.

Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 5$). ns : non significativement différente de 0%. 5 dernières minutes: le temps d'incubation entre la 10^{ème} et la 15^{ème} minute de l'incubation.

5.4. Effet de la déplétion des réserves calciques

Dans cette expérience, le milieu d'incubation est remplacé par la solution physiologique contenant de la caféine 20 mM. La caféine induit une contraction phasique de courte durée suivie par une relaxation totale du muscle après 2 minutes d'incubation (Fig. 34A). Dans ce cas, la caféine induit une relaxation totale du muscle lisse (0.10 ± 0.01 g, $n = 5$, $P \leq 0.05$; basal: 0.25 ± 0.03 g, $n = 5$; Fig. 34B). Comparées aux résultats obtenus avec le peroxy ABAP 98 μ M seul, les bandelettes incubées en présence de la caféine 20 mM restent silencieuses et leur tonus reste fortement diminué (0.09 ± 0.01 g, $n = 5$, $P \leq 0.05$; ABAP: 0.12 ± 0.03 g; Fig. 34B).

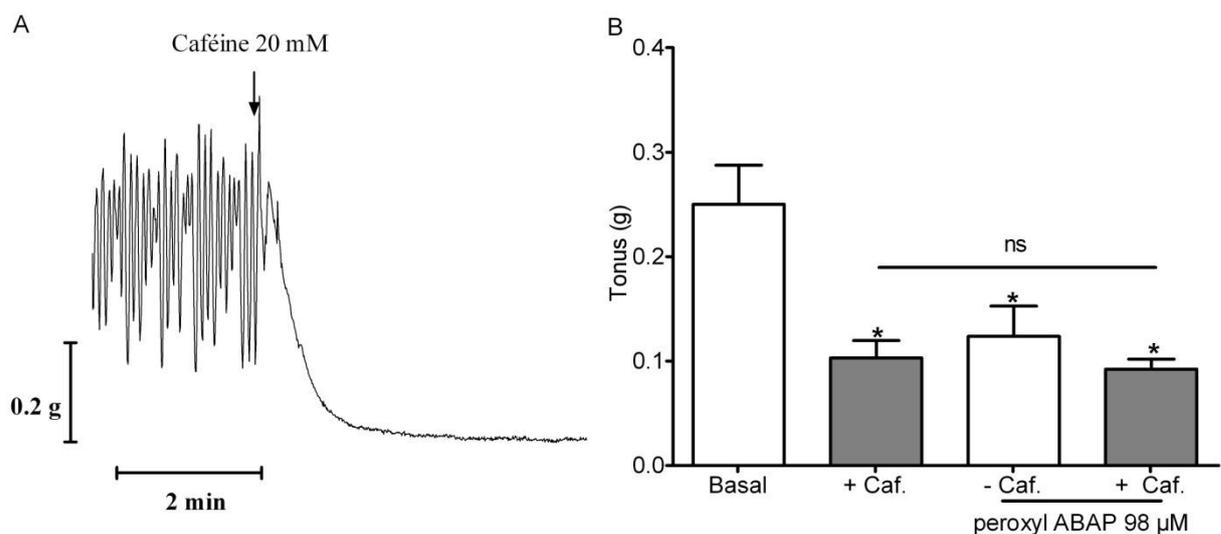


Figure 34. A: Enregistrement typique de l'effet de la caféine 20 mM sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. **B:** Influence de la caféine sur la réponse des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin au peroxy ABAP.

Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 5$). * $P \leq 0.05$: comparaison par rapport au basal sauf indication. ns : non significatif.

5.5. Inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique

L'acide nordihydroguaiarétique (NDGA) 30 μ M, la quinacrine 10 μ M et l'indométhacine 10 μ M sont ajoutés au milieu d'incubation pendant 20 minutes avant l'addition du peroxy ABAP 98 μ M. L'observation des enregistrements des contractions révèle que l'éthanol (véhicule) n'a pas d'effet sur la contraction spontanée (Fig. 35A). Une diminution progressive du tonus, de l'amplitude et de la fréquence des contractions est notée avec le NDGA (Fig. 35B). La quinacrine induit une augmentation du tonus de repos des contractions phasiques, une diminution de l'amplitude et une perte de la régularité des contractions (Fig. 35C). L'application de

l'indométhacine induit une forte perturbation dans les contractions phasiques (Fig. 35D).

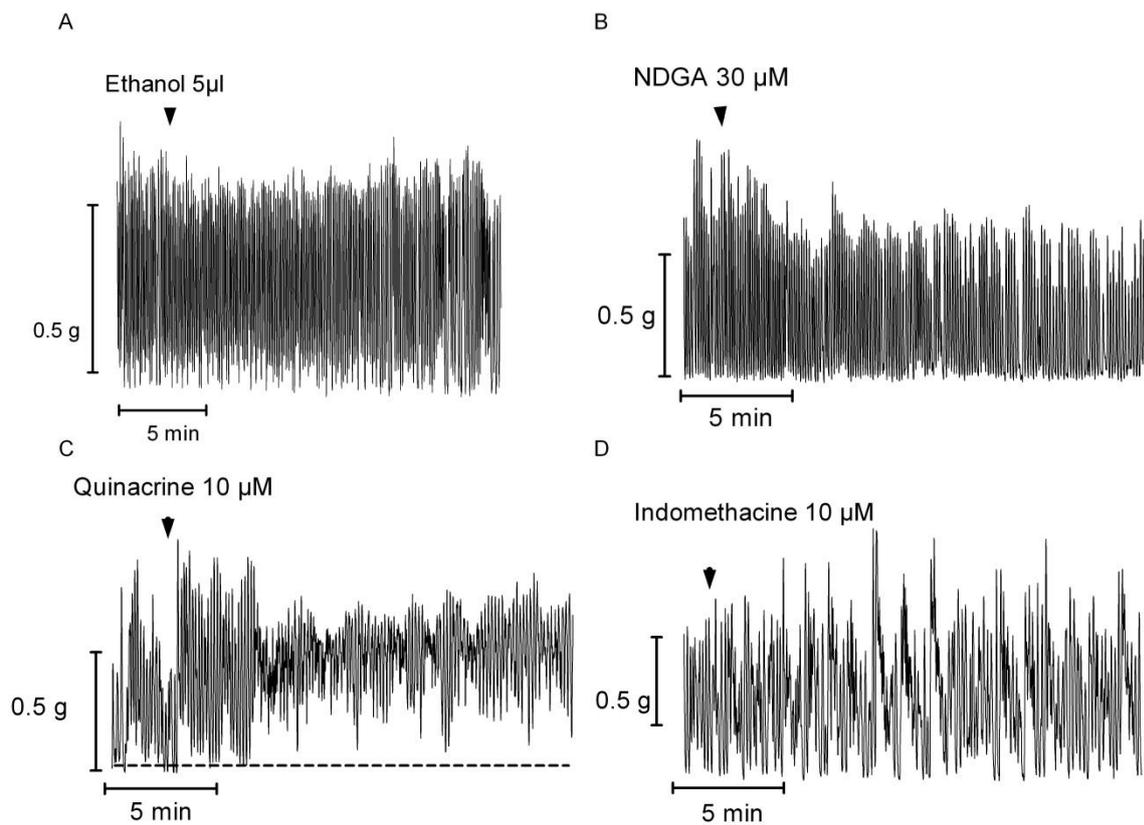


Figure 35. Enregistrements typiques de l'effet de l'éthanol, du NDGA, de la quinacrine et de l'indométhacine sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. La ligne discontinue représente le niveau du tonus de repos basal.

Le NDGA induit une diminution du tonus de repos des contractions à 0.18 ± 0.03 g ($n = 7$, $P > 0.05$; basal: 0.27 ± 0.04 g, $n = 7$; Fig. 36A). L'amplitude et la fréquence des contractions sont légèrement diminuées ($P > 0.05$; Fig. 36B-C). L'addition du peroxy ABAP $98 \mu\text{M}$ après le NDGA diminue d'avantage le tonus (0.13 ± 0.02 g, $n = 7$, $P > 0.05$), ne modifie pas l'amplitude ($P > 0.05$) et diminue la fréquence des contractions de 48.7% ($P \leq 0.05$; NDGA: 7.0 ± 0.8 cpm; $n = 7$). Le tonus de repos des contractions et le taux de la relaxation induite par le peroxy ABAP $98 \mu\text{M}$ en présence du NDGA ne sont pas différents de ceux notés avec le peroxy ABAP seul ($P > 0.05$; Fig. 36A, 37). Par ailleurs, la présence du NDGA avec le peroxy ABAP induit une diminution de l'amplitude (65.8%) et de la fréquence (42.0%) des contractions phasiques par rapport au témoin ($P \leq 0.05$; Fig. 36B-C). Cependant, le traitement avec le NDGA multiplie par trois le silence induit par le peroxy ABAP, mais avec une très grande variabilité (peroxy ABAP: 117 ± 31 s, $n = 6$; NDGA + peroxy ABAP: 354 ± 142 s, $n = 7$, $P > 0.05$).

En présence de la quinacrine, les contractions phasiques sont caractérisées par un tonus de repos élevé (quinacrine: 0.27 ± 0.03 g, $n = 7$, $P \leq 0.05$; basal: 0.19 ± 0.01 g; Fig. 36A), une

amplitude et une fréquence peu diminuées ($P > 0.05$; Fig. 36B, C). En présence de la quinacrine, le peroxy ABAP 98 μM diminue le tonus de repos (0.14 ± 0.03 g, $n = 7$, $P \leq 0.05$), augmente faiblement l'amplitude des contractions (0.78 ± 0.09 g, $n = 7$, $P > 0.05$; quinacrine: 0.47 ± 0.08 g, $n = 7$; Fig. 36B) sans changer la fréquence ($P > 0.05$). Le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions en présence du peroxy ABAP 98 μM et de la quinacrine ne sont pas différents de ceux notés avec le peroxy ABAP seul ($P > 0.05$; Fig. 36A-C). Le taux de la relaxation induite par le peroxy ABAP en présence de la quinacrine est de $30.1 \pm 17.6\%$ ($n = 7$, $P > 0.05$; Fig. 36). Le silence observé avec le peroxy ABAP disparaît lors du prétraitement du tissu avec la quinacrine (17 ± 8 s, $n = 7$, $P \leq 0.05$).

L'incubation des bandelettes longitudinales en présence de l'indométhacine 10 μM ne modifie pas de manière significative le tonus, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques ($P > 0.05$; Fig. 36A-C). En présence de l'indométhacine, le peroxy ABAP 98 μM diminue le tonus de 47.0% ($P \leq 0.05$; Fig. 36A), mais sans affecter de manière significative l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques ($P > 0.05$; Fig. 36B-C). En présence de l'indométhacine, le tonus, l'amplitude, la fréquence et la relaxation induite par le peroxy ABAP 98 μM ne sont pas différents de ceux notés avec le peroxy ABAP seul ($P > 0.05$; Fig. 36A-C, Fig. 37). Cependant, une légère augmentation de la durée du silence est notée (194 ± 68 s, $n = 6$, $P > 0.05$).

5.6. Inhibition des tyrosines phosphatases

Le vanadate 1 mM est laissé au contact du tissu pendant 30 min avant l'addition du peroxy ABAP 98 μM . Le vanadate induit une perte du rythme des contractions phasiques (Fig. 38A) et une augmentation du tonus de repos de 0.27 ± 0.06 g ($n = 6$) à 0.73 ± 0.13 g ($n = 6$, $P \leq 0.05$, Fig. 38B) sans modifier l'amplitude et la fréquence des contractions ($P > 0.05$; Fig. 38C-D). En présence du vanadate, le peroxy ABAP diminue le tonus de repos de 69.8% ($P \leq 0.05$; Fig. 38A) et augmente l'amplitude des contractions (51.1%; $P \leq 0.05$; Fig. 38B), sans toutefois modifier la fréquence des contractions ($P > 0.05$; Fig. 38C).

En présence du vanadate, le tonus, l'amplitude, la fréquence et la relaxation induite par le peroxy ABAP 98 μM ne sont pas différents de ceux notés avec le peroxy ABAP seul ($P > 0.05$; Fig. 33A-C). Par contre, la durée du silence est multipliée par 2.2 fois (peroxy ABAP: 88.3 ± 21 s, $n = 6$; vanadate + peroxy ABAP: 198 ± 21 s, $n = 6$, $P \leq 0.05$)

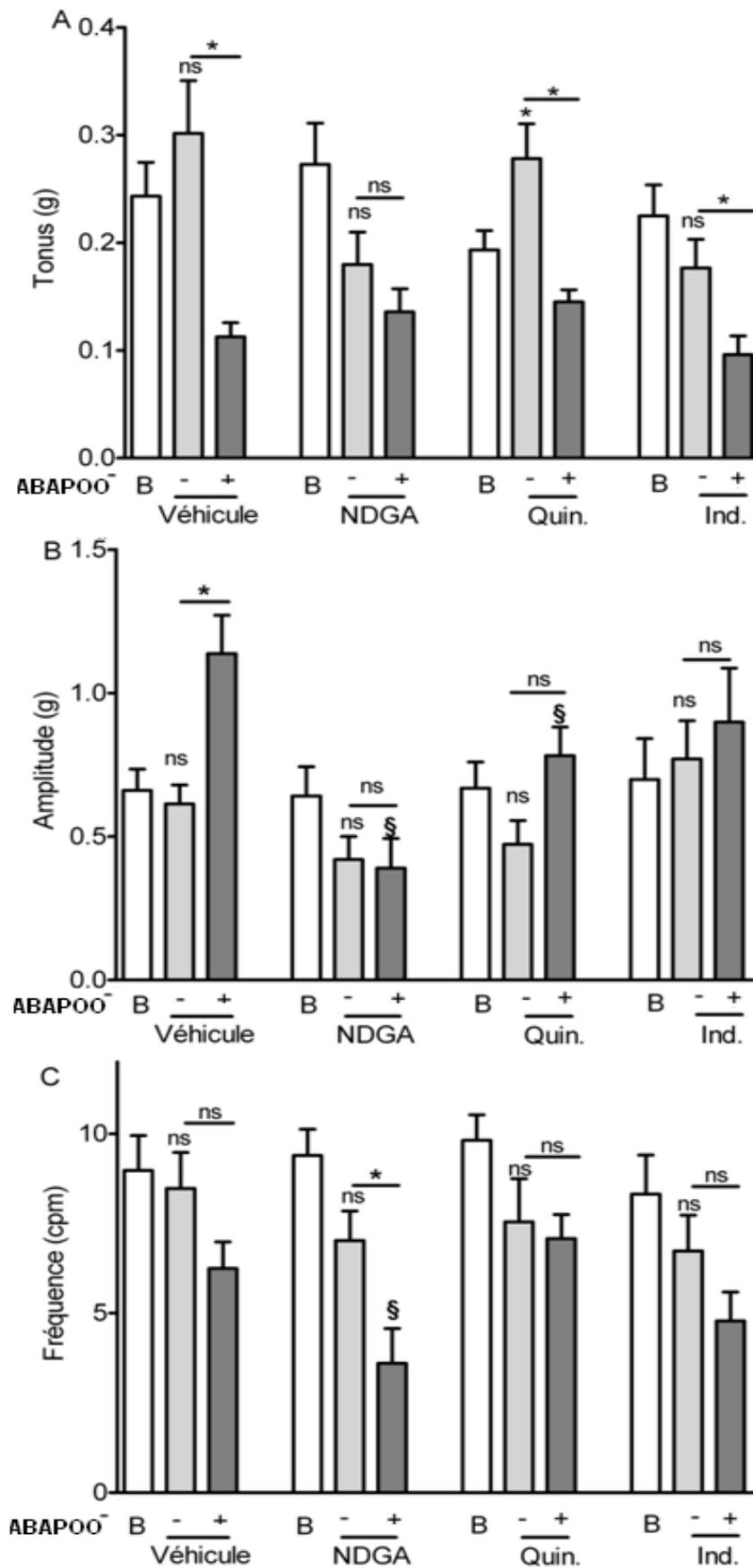


Figure 36. Influence du NDGA 30 μM, de la quinacrine 10 μM et de l'indométhacine 10 μM sur la réponse des bandelettes longitudinales de lapin au peroxy/ ABAP 98 μM.

Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 7) pour NDGA et la quinacrine et (n = 6) pour l'indométhacine.

*P≤0.05:

comparaison par rapport au basal.

§P≤0.05:

comparaison par rapport au véhicule (éthanol 5 μl).

Eth.: éthanol, Quin.: quinacrine, Ind.: indométhacine.

ns: non significatif.

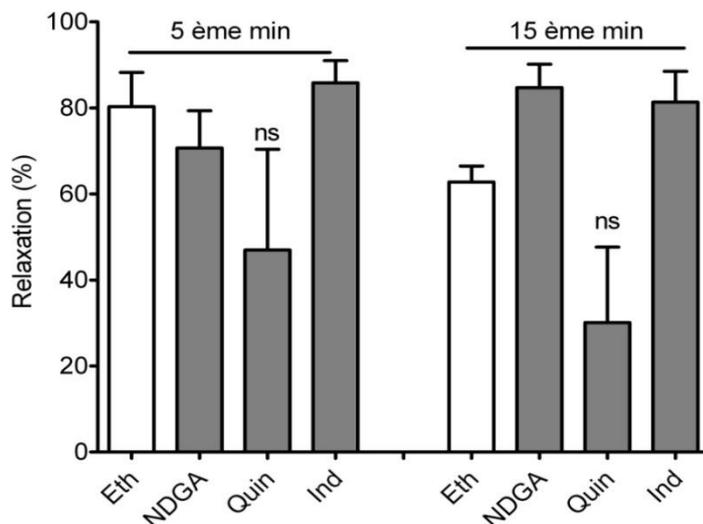


Figure 37. Effets du NDGA 30 μM, de la quinacrine (Quin.) 10 μM et de l'indométhacine (Ind.) 10 μM sur la relaxation induite par le peroxy ABAP 98 μM exprimée en pourcent par rapport à la relaxation induite par la papavérine 100 μM (100%). Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 7) pour NDGA et la quinacrine et (n = 6) pour l'indométhacine. ns : non significativement différent de 0%.

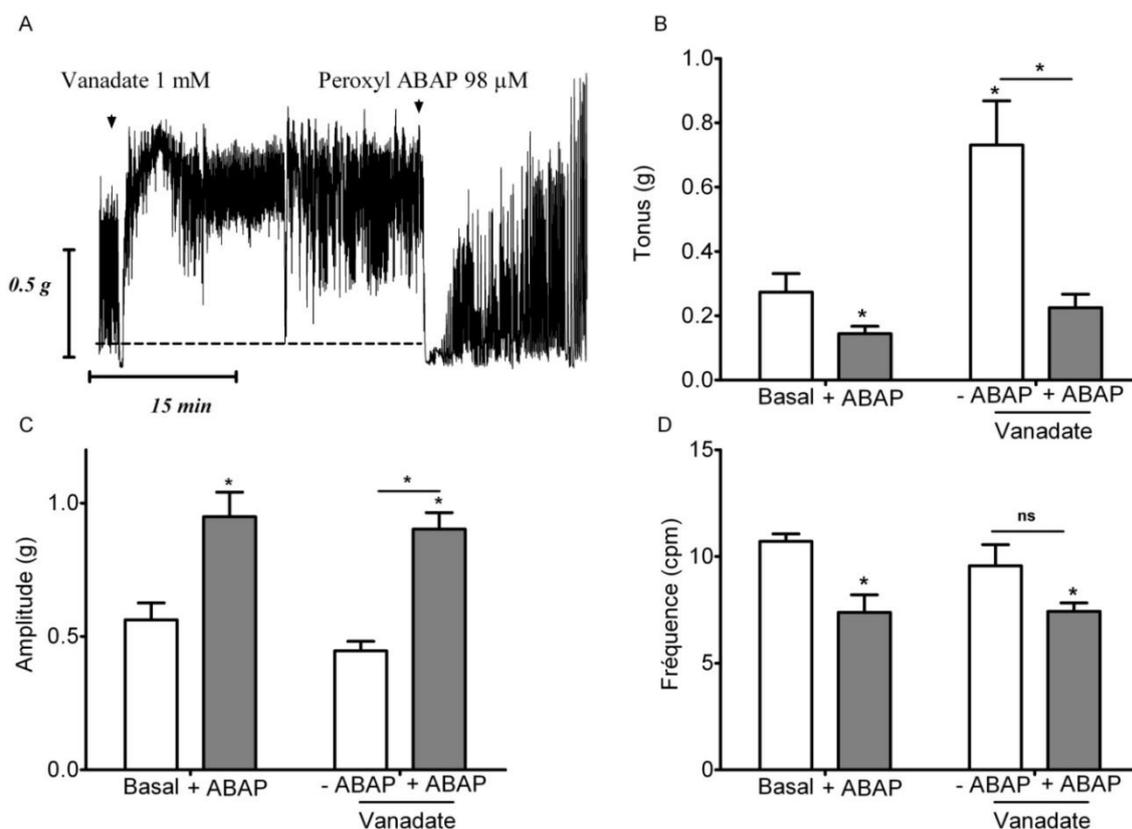


Figure 38. A: Enregistrement typique de l'effet du vanadate sur la contraction spontanée des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin. **B-D:** Influence du vanadate 1 mM sur la réponse des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin au peroxy ABAP. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 6). *P<0.05: comparaison par rapport au basal sauf indication. ns: non significatif. La ligne discontinue représente le niveau du tonus basal.

Discussion

1. La contraction musculaire spontanée

Le muscle lisse du tractus gastro-intestinal est caractérisé par une activité mécanique rythmique (contraction spontanée). Dans la présente étude, les bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin se contractent avec une fréquence de 10.5 cpm, une valeur qui n'est pas différente de celle observée dans plusieurs études (Candura et al., 1994; Grasa et al., 2004). Les préparations des bandelettes du duodénum et du jéjunum se contractent avec une fréquence proche de celle de l'iléon (Grasa et al., 2005). L'activité contractile spontanée est aussi observée dans l'intestin grêle d'autres animaux. Dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon du cobaye, la fréquence des contractions est de 10 cpm (Gwynne et al., 2004) alors qu'elle est trois fois plus grande chez la souris (Baldassano et al., 2008; Ueno et al., 2004a). La contraction spontanée des muscles lisses n'est pas spécifique au tractus gastro-intestinal, elle est aussi observée, avec des fréquences différentes, dans la musculature de la vessie, des vaisseaux sanguins et de l'utérus (Balemba et al., 2006; Datte et al., 1999; Hoffmann et al., 2003). La contraction des muscles lisses est reliée au potentiel d'action de ces cellules musculaires (Sevcencu et al., 2008) déclenchée par les ondes lentes des ICC (Alberti et al., 2007; Bywater et al., 1989). La dépolarisation membranaire, induite par le potentiel d'action, induit l'augmentation de l'influx du Ca^{2+} à travers les canaux calciques voltage-dépendants et la mobilisation du Ca^{2+} des réserves sarcoplasmiques via les récepteurs de l'IP3 (Balemba et al., 2006).

1.1. Effet de la mobilisation du calcium

Le traitement des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin avec le vérapamil induit un arrêt des contractions rythmiques et une diminution du tonus. Cet effet est aussi observé dans plusieurs études précédentes (Gilani et al., 2008; Grasa et al., 2004; Shimamura et Sunano, 1988). Les canaux calciques membranaires de type L jouent un rôle important dans la contraction spontanée des muscles lisses car leur blocage par la nifédipine, le vérapamil ou la nifédipine induit une diminution du tonus de repos, de l'amplitude et de la fréquence des contractions spontanées du tractus gastro-intestinal (Daniel et al., 2004; Grasa et al., 2004; Mulè et Serio, 2001).

Dans nos expériences, l'incubation de l'iléon avec la caféine induit un pic de contraction phasique suivie par un arrêt des contractions, cet effet est le résultat de la déplétion des réserves calciques par la caféine. Un pic transitoire ne dépassant pas 30% de la contraction induite par l'acétylcholine est aussi observé lors du traitement de l'iléon du cobaye avec la caféine (Bauer et al., 1991). L'apparition de ce pic de contraction est probablement due à la libération du calcium

intracellulaire puisque la caféine augmente la concentration du calcium intracellulaire (Hashitani et al., 2001; Morales et al., 2005; Ohta et al., 2000). La caféine a un effet inhibiteur sur la contraction spontanée (Grasa et al., 2004; Jiang et al., 2005); cet effet est relié à l'AMPC (Watanabe et al., 1992; Yi et al., 2006) puisque la caféine augmente la concentration d'AMPC par inhibition de l'activité de la phosphodiesterase (Shafer et al., 1998). La déplétion des réserves internes du Ca^{2+} par la caféine est due à l'activation des récepteurs de la ryanodine et de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (Morales et al., 2005).

1.2. Influence de la médiation cholinergique et de la conduction nerveuse

L'inhibition des récepteurs nicotiques ganglionnaires par l'hexaméthonium n'a aucun effet sur la contraction spontanée, suggérant que la contraction spontanée de l'iléon n'est pas contrôlée par la transmission nicotinique des neurones ganglionnaires excitateurs (Spencer et al., 2000b), et que cette activité rythmique est d'origine myogène (cellule musculaire). Même chez la souris, les contractions phasiques de l'iléon sont indépendantes de la libération de l'acétylcholine des neurones cholinergiques excitateurs (Baldassano et al., 2008).

L'application de l'atropine diminue légèrement le tonus de repos, sans affecter l'amplitude et la fréquence des contractions, suggérant que la contraction spontanée des bandelettes de l'iléon de lapin n'est pas contrôlée par l'activation des récepteurs muscariniques. Des résultats similaires ont été obtenus avec le côlon du lapin et du rat (Benabdallah et al., 2008; Gonzalez et Sarna, 2001a). L'activation des récepteurs muscariniques semble être impliquée dans le maintien du tonus de repos des contractions puisque l'application de l'atropine diminue le tonus de repos des contractions de 12%.

Dans la présente étude, la lidocaïne, un anesthésique local, a un effet spasmogène qui se manifeste par une perturbation des contractions spontanées avec une légère augmentation du tonus de repos, une légère diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions. L'effet spasmogène de la lidocaïne est aussi observé dans le côlon du rat, avec une augmentation durable du tonus et une inhibition des contractions phasiques (Borjesson et al., 1997). L'effet anesthésique de la lidocaïne est dû au blocage des canaux Na^+ voltage-dépendants et à l'inhibition des canaux calciques (Josephson et Sperelakis, 1976). La lidocaïne implique la diminution de la concentration d'AMPC pour augmenter le tonus de repos puisque ce dernier est diminué après l'addition de la papavérine, un inhibiteur de la phosphodiesterase (Borjesson et al., 1997). De même, l'augmentation du tonus de repos par la lidocaïne est due à l'inhibition des canaux potassiques sensibles à l'ATP (Kinoshita et al., 2003).

1.3. Influence de l'isoprotérénol

Le traitement des bandelettes par l'isoprotérénol, un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, induit un arrêt des contractions rythmiques et une diminution du tonus. L'effet relaxant de l'isoprotérénol est aussi observé dans les muscles lisses du côlon utilisés sous forme de segments ou de bandelettes circulaires, du fundus gastrique et du muscle longitudinal ciliaire (Carnicelli et al., 2000; Fusi et al., 1998; Matsumoto et al., 2005; Mulè et al., 1999b). L'isoprotérénol induit la relaxation des segments de l'iléon du cobaye et des bandelettes longitudinales de l'utérus du rat par l'augmentation de la concentration d'AMPc (Criswell et Loch-Carusio, 1999; Ostrom et Ehlert, 1997)

1.4. Effets des antagonistes des canaux potassiques

Les canaux potassiques jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et la régulation de la contraction du muscle lisse (Shieh et al., 2000). L'activation des canaux K^+ augmente la conductance du K^+ , ce qui hyperpolarise la membrane et induit la relaxation du muscle lisse (Langheinrich et Daut, 1997). Par contre, le blocage des canaux potassiques avec le TEA ou la 4-AP induit une contraction des muscles lisses mettant en jeu l'entrée du calcium via les canaux calciques de types L car le vérapamil abolit cette contraction (Dong et al., 2005).

Dans nos expériences, le TEA, un inhibiteur non sélectif des canaux potassiques, augmente significativement le tonus de repos, diminue l'amplitude et la fréquence des contractions, cet effet ressemble à certains égards à une contraction tonique. Ce résultat suggère que le tonus de repos des contractions phasiques de l'iléon de lapin est contrôlé par les canaux potassiques. Plusieurs études confirment que le blocage des canaux potassiques avec le TEA augmente le tonus de repos des contractions du côlon, du duodénum, du jéjunum et de l'iléon (Benabdallah et al., 2008; Dong et al., 2005; Lamarca et al., 2006).

Nos résultats montrent que l'application de la 4-AP aux bandelettes de l'iléon induit une augmentation du tonus de repos et une diminution dans la fréquence des contractions. Le blocage des canaux potassiques voltage-dépendants (K_v) par la 4-AP induit deux types de réponse. Dans la majorité des cas, la 4-AP diminue l'amplitude des contractions; dans les autres cas, l'amplitude des contractions est augmentée. La réponse bimodale est aussi observée dans le duodénum de la souris (Dong et al., 2005) et dans le cas du blocage des canaux potassiques du côlon avec le TEA (Benabdallah et al., 2008). Dans des préparations circulaires du côlon du rat, la 4-AP (5 et 10 mM) induit une augmentation du tonus de repos et une inhibition transitoire des contractions spontanées pendant 10 à 20 minutes; passé ce délai, le muscle lisse reprend son activité mécanique avec une amplitude et une fréquence des contractions plus élevées (Alberti et Jimenez, 2005).

Le clotrimazole est utilisé comme un inhibiteur des canaux potassiques activés par le Ca^{2+}

(Joiner et al., 2003; Tofukuji et al., 1998). Nos résultats montrent que le clotrimazole induit une diminution significative de l'amplitude des contractions, alors que le tonus et la fréquence des contractions sont inchangés. Les canaux K_{Ca} sont activés par l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et la dépolarisation membranaire et jouent un rôle important dans l'excitabilité des muscles lisses du tube digestif (Carl et al., 1995). Le blocage des canaux K_{Ca} par le clotrimazole induit une constriction transitoire de l'artère et des vaisseaux sanguins coronaires du rat (Steinmetz et al., 2000; Tofukuji et al., 1998).

1.5. Effets des inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique

Le NDGA 30 μ M, un inhibiteur de la lipoxygénase, induit une légère diminution du tonus, de l'amplitude et de la fréquence des contractions rythmiques. Ce faible effet est probablement relié à la faible concentration utilisée du NDGA. La tendance à l'inhibition des contractions serait due à l'activation des canaux potassiques par le NDGA (Nagano et al., 1996). Le NDGA peut aussi inhiber les canaux calciques des cellules hypophysaires par un effet qui serait dû à l'interaction du NDGA avec les canaux calciques ou avec une protéine membranaire qui module l'activité de ces canaux (Korn et Horne, 1990).

L'indométacine est utilisé pour inhiber la synthèse des prostaglandines (Pourmahram et al., 2008). L'application de l'indométacine 10 μ M induit une légère diminution du tonus de repos, sans modifier l'amplitude et la fréquence des contractions. Dans des préparations longitudinales du fundus gastrique du rat, l'indométacine 10 μ M induit une diminution de l'amplitude des contractions, sans modifier le tonus basal (Afshin et al., 2005). Par contre, la même concentration d'indométacine augmente l'amplitude des contractions phasiques des bandelettes de l'iléon et du jéjunum du rat (Koyluoglu *et al.*, 2008).

La quinacrine, un inhibiteur de la phospholipase A_2 , induit une augmentation significative du tonus des contractions accompagnée d'une légère diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions. L'application de la quinacrine au muscle lisse de l'utérus du rat n'affecte pas la fréquence et la force des contractions (Criswell et Loch-Caruso, 1999). L'acide arachidonique libéré par l'action de la PLA_2 contribue au contrôle de la contraction spontanée des muscles lisses (Alcon et al., 2000). Les dérivés métaboliques de l'acide arachidonique, comme la PGI_2 et la PGE_2 , contribuent à la relaxation des muscles lisses (Prasad et Gupta, 2002), cet effet est abolit par la quinacrine (Marathe et al., 1996). De plus, l'acide arachidonique et ses dérivés métaboliques activent les canaux potassiques et induisent l'hyperpolarisation de la membrane, conduisant à la relaxation des muscles lisses (Campbell et al., 2003).

1.6. Effet de l'orthovanadate

L'incubation des bandelettes de l'iléon de lapin en présence de l'orthovanadate 1 mM induit une augmentation significative du tonus des contractions, mais sans modifier ni la fréquence ni l'amplitude des contractions. Plusieurs études avaient montré que l'orthovanadate induit la contraction des préparations musculaires de l'estomac, de l'iléon, du côlon et de la vessie (Alcon et al., 2000; Grasa et al., 2006; Li et al., 2006; Mori et Tsushima, 2004; Petkov et al., 1998). L'inhibition des tyrosines phosphatases par le vanadate favorise l'effet des tyrosine kinases qui à leur tour activent les canaux calciques voltage-dépendants et/ou inhibent la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, et augmentent la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Alcon et al., 2000; Di Salvo et al., 1993; Kuriyama et al., 1998; Mori et Tsushima, 2004; Wijetunge et al., 1998). L'effet contractile du vanadate dépend de l'ouverture des canaux calciques de type L puisque leur inhibition par le vérapamil abolit la contraction induite par le vanadate (Lee et al., 1994).

2. La contraction musculaire stimulée

2.1. La contraction induite par le carbachol

Dans la présente étude, le traitement des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin avec le carbachol se traduit par l'apparition d'une contraction biphasique : une contraction phasique rapide suivie par une contraction tonique. Ce type de réponse a été aussi observé dans l'iléon et le côlon de la souris, du rat, du cobaye et du lapin (Baldassano et al., 2008; Benabdallah et al., 2008; McCarron et al., 2002; Poole et Furness, 2007; Takeuchi et al., 2001). La contraction des muscles lisses induite par le carbachol est due à l'activation des récepteurs muscariniques (Sales et al., 1997; Yousufzai et al., 2000) qui induit la production du 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol par activation de la phospholipase C (Espanol et Sales, 2000; Sales et al., 1997; Takeuchi et al., 2001). La réponse biphasique résulte de la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires par l'action de l'IP₃ sur ses récepteurs et de l'entrée, dans un second temps, du Ca^{2+} par les canaux calciques de type L (Magalhaes et al., 2004; Sim et al., 2001; Takeuchi et al., 2001).

2.2. La contraction induite par le KCl et le BaCl₂

L'incubation des bandelettes de l'iléon de lapin avec le KCl 80 mM induit une contraction biphasique: une contraction phasique et une contraction tonique durable séparées par une petite relaxation de courte durée; ce type de réponse a été aussi observé dans l'iléon, le côlon et l'estomac (Dai et al., 2003; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2007). Le KCl induit la dépolarisation membranaire et active les canaux calciques voltage-dépendants (canaux calcique

de type L), ce qui induit l'augmentation du calcium intracellulaire et la force de contraction du muscle (Buharalioglu et Akar, 2002; Grasa et al., 2004). En effet, le blocage des canaux calciques de type L par le vérapamil ou la nifédipine abolit la contraction induite par le KCl (Murillo et al., 1997).

Dans nos expériences, le traitement des bandelettes longitudinales avec le BaCl₂ induit une contraction phasique suivie par une contraction tonique durable. Le même effet est également observée avec le duodénum du mouton (Murillo et al., 1997). Le BaCl₂, comme le KCl, induit la dépolarisation de la membrane plasmique (Flynn et al., 1999; Huizinga et al., 1991) et active les canaux calciques de type L pour induire la contraction musculaire du fait qu'elle est inhibée par le nifédipine et activée par le BayK8644, un ouvreur des canaux calciques de type L (Sgaragli et al., 1993). En plus de son effet contractile, le BaCl₂ peut inhiber la conductance potassique (Karaki et al., 1986; Murillo et al., 1997).

2.3. La contraction induite par la stimulation électrique

Dans la présente étude, la stimulation électrique (20 Hz, largeur des impulsions 0.5 millisecondes et 30 minutes de stimulation) induit une réponse monophasique reproductible pendant toute la durée de la stimulation. La contraction induite par la stimulation électrique dépend de la fréquence utilisée lors de la stimulation (Kitazawa et al., 2002; Mitsui et al., 2006). La contraction résulte de la stimulation des neurones cholinergiques puisqu'elle est complètement inhibée par l'atropine et la tétrodotoxine (TTX) (Kitazawa et al., 2002).

3. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction spontanée

L'incubation des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin avec l'ABAP non décomposé (20 mM) ou avec différentes concentrations de peroxy ABAP induit une réponse biphasique : un silence suivi par une reprise de l'activité contractile d'amplitude légèrement augmentée. La réponse biphasique de l'ABAP (20 et 40 mM) a été également observée avec le jéjunum du lapin à la suite de l'addition de l'ABAP 23.68 mM (Peluso et al., 2002). Un effet osmotique de l'ABAP est à exclure puisque le mannitol à la même concentration que celle de l'ABAP ne modifie pas le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions. Par ailleurs, le silence observé n'est pas dû dans sa totalité au peroxy ABAP seul puisque l'ABAP non décomposé arrête momentanément les contractions phasiques. L'augmentation de la concentration de l'ABAP (40 mM) et de son peroxy (196 µM) multiplie le silence par un facteur de 2.5, suggérant alors que le silence est dû à la molécule ABAP et qu'il peut être prolongé par les radicaux peroxy. Les effets du peroxy ABAP sont réversibles après son élimination par le lavage,

suggérant que la peroxydation induite par les peroxy ABAP a de faibles effets sur la contraction spontanée ou bien ils sont réduits par les mécanismes de défense cellulaires (Peluso et al., 2002). Par contre, l'utilisation de fortes concentrations en apparence de peroxy ABAP, réduit l'amplitude et la fréquence des contractions spontanées du jéjunum de lapin (Peluso et al., 2002).

Dans la présente étude, la durée du silence est diminuée par le blocage des récepteurs muscariniques et nicotiniques, respectivement avec l'atropine et l'hexaméthonium, et par l'inhibition de la conduction nerveuse avec la lidocaïne, suggérant que la transmission nicotinique et la propagation du potentiel d'action sont impliquées dans la médiation de l'inhibition de la contraction spontanée par l'ABAP en premier lieu et peut être par le peroxy ABAP.

En présence du peroxy ABAP, l'inhibition de la contraction spontanée par l'isoprotérénol persiste toujours, cela démontre que le peroxy ABAP n'a pas d'effet sur la voie de signalisation qui implique les récepteurs β -adrénergiques et la formation de l'AMPc. Cependant, il a été rapporté que les radicaux libres peuvent diminuer la réponse des récepteurs bêta-adrénergiques, probablement par inhibition directe de l'activité de l'adényl cyclase membranaire (Gesquiere et al., 2000), expliquant de fait l'augmentation de l'amplitude des contractions.

Le traitement des bandelettes longitudinales de l'iléon du lapin avec le clotrimazole, antagoniste des canaux K_{Ca} , diminue la durée du silence induit par l'ABAP, suggérant que l'ABAP ouvrirait transitoirement ce type de canaux. En effet, l'oxydation des résidus SH des canaux K_{Ca} par la monochloramine augmente l'activité de ces canaux et hyperpolarise les cellules musculaires lisses du côlon (Prasad et al., 1999). La nature des radicaux joue un rôle important dans la détermination de l'effet des radicaux sur les canaux potassiques. En effet, le H_2O_2 induit l'hyperpolarisation des muscles lisses par l'activation des canaux K_{Ca} ; alors que le peroxy nitrite ($ONOO^-$) inhibe ces canaux (Barlow et al., 2000; Liu et Gutterman, 2002). La diminution du tonus de repos (relaxation) par le peroxy ABAP implique l'activation partielle des canaux potassiques puisque le blocage des canaux potassiques avec le TEA et la 4-AP en présence du peroxy ABAP présente un tonus de repos plus élevé que celui noté avec le peroxy ABAP seul. La relaxation induite du muscle lisse de l'artère du rat par l'ischémie dépend de l'ouverture des canaux potassiques sensibles à l'ATP puisque elle est diminuée par le blocage des canaux K_{ATP} à l'aide du glibenclamide (Kinoshita et al., 2003).

L'incubation des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin avec la quinacrine réduit la durée du silence induite par l'ABAP, suggérant que la durée du silence dépend du pool d'acide arachidonique libre présent dans les réserves tissulaires. Il a été montré que le stress oxydatif (peroxyde d'hydrogène, t-butyl hydroperoxyde) est capable de stimuler la libération de l'acide arachidonique des réserves des muscles lisses des vaisseaux et des fibroblastes pulmonaires en

culture (Cane et al., 1998; Taylor et al., 1983). La conversion ultérieure de l'acide arachidonique en leucotriènes, par la voie de la lipoxygénase (Agnès et al., 1998; Barlow et al., 2000), rendrait compte de la reprise de l'activité contractile de l'iléon en présence du peroxy ABAP car les leucotriènes sont des médiateurs contractiles des muscles lisses (Alcon et al., 2001; Ieiri et al., 2001; Matyas et al., 2002; Percy et al., 1990; Setoguchi et al., 2001). En effet, l'inhibition de la PLA₂ par la quinacrine et de la lipoxygénase par le NDGA diminuent l'amplitude et la fréquence des contractions de l'iléon en présence du peroxy ABAP. La voie de synthèse des prostaglandines, par la cyclooxygénase, n'est probablement pas importante car le traitement des bandelettes avec l'indométacine a failli donner un effet significatif. La sensibilité du muscle lisse circulaire et longitudinale aux prostanoides est relativement réduite au niveau de l'iléon terminal et le côlon de l'homme (Bennett et al., 1981).

Le blocage des canaux calciques par le vérapamil et la déplétion des réserves intracellulaires abolit les contractions phasiques (Grasa et al., 2004). Dans la présente étude, le blocage des canaux calciques de type L par le vérapamil et la déplétion des réserves calciques intracellulaires par la caféine abolissent les contractions phasiques des bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin en présence du peroxy ABAP, suggérant que la reprise des contractions après la période de silence dépend de l'entrée du calcium extracellulaire par les canaux calciques de type L et de la libération du Ca²⁺ des réserves intracellulaires. En présence du vérapamil et non de la caféine, l'augmentation de la concentration du peroxy ABAP au cours de l'incubation induit une légère reprise de l'activité phasique, suggérant que l'effet bloquant du vérapamil est réduit par le peroxy ABAP à une concentration supérieure ou égale à 220 µM (dans les chambres à organe). En plus de son effet bloquant des canaux calciques, le vérapamil se comporte comme un antioxydant contre les radicaux hydroxyles (OH[•]) et les radicaux peroxy générés par l'ABAP (Aruoma et al., 1991; Kang et al., 1998), ce qui peut induire une diminution de son pouvoir bloquant vis-à-vis des canaux calciques.

Dans la présente étude, l'addition du peroxy ABAP inhibe la contraction induite par le vanadate, suggérant que l'effet du vanadate est contrarié par le peroxy ABAP et que ce dernier peut induire l'inhibition de la phosphorylation des protéines kinase et/ou l'activation des protéines phosphatases. L'inhibition des protéines kinases par la génistéine, un inhibiteur des tyrosines kinases, inhibe la contraction induite par le vanadate et induit la relaxation du muscle lisse (Alcon et al., 2000; Di Salvo et al., 1993). Cet effet résulte de l'inhibition partielle de la libération du calcium des réserves intracellulaires et de l'inhibition de l'entrée capacitative du calcium extracellulaire via l'inhibition des canaux calciques de type L (Nakayama et al., 2006; Ohta et al., 2000).

L'addition cumulée du t-BHP (0.03-1 mM) aux bandelettes de l'iléon de lapin induit une

diminution progressive du tonus et de l'amplitude au cours du temps et de manière dépendante de la concentration. De la même manière, l'hydroperoxyde de cumène diminue la contraction de la vessie du porc induite par la stimulation électrique et le carbachol (De Jongh et al., 2007). L'inhibition des contractions phasiques ou induites peut résulter d'une déplétion du calcium libérable induite par le t-BHP ou le H₂O₂ (Bellomo et al., 1982; Cao et al., 2004) et de l'activation des canaux potassiques de large conductance par ces oxydants (Barlow et al., 2000; Shin et al., 2000). Les canaux potassiques de large conductance interviennent dans le maintien du tonus de repos car la charybdotoxine, antagoniste des canaux K_{Ca}, dépolarise la membrane et augmente le tonus de repos (Carl et al., 1995; Grasa et al., 2005), alors que l'augmentation de l'activité de ces canaux inhibe les contractions phasiques (Imai et al., 2001).

4. Effets de l'ABAP et du t-BHP sur la contraction induite

Le peroxy ABAP (98 µM) n'a aucun effet sur les contractions phasiques induites par la stimulation électrique; mais le silence habituellement observé à la suite de l'addition de l'ABAP est réduit dans sa durée. Ces résultats suggèrent que le peroxy ABAP n'interfère pas avec la transmission nerveuse ni avec l'activation des récepteurs muscariniques induite par la stimulation électrique. La réduction de la durée du silence pourrait résulter de la contraction du muscle par les quanta d'acétylcholine (Furness, 2006). Le prétraitement de l'iléon de lapin avec le peroxy ABAP et le t-BHP ne modifie pas la réponse du muscle lisse au carbachol, suggérant que ces deux radicaux libres n'affectent pas les récepteurs muscariniques. Cela peut être dû aux faibles concentrations de peroxy ABAP utilisées. Plusieurs études ont montré que la contraction induite par l'activation des récepteurs muscariniques est réduite par l'application des radicaux libres (Peluso et al., 2002; Saito et al., 2007). Le traitement de l'iléon du cobaye et le jéjunum du lapin avec différentes concentrations d'ABAP (1.5 à 11.5 mM) diminue la contraction induite par l'acétylcholine d'une manière dépendante de la concentration (Peluso et al., 2002). L'absence d'effets du peroxy ABAP suggère que les réserves intracellulaires de calcium sont à peine altérées par le peroxy ABAP ou le t-BHP, cela peut être dû aux faibles concentrations utilisées (98 µM et 1 mM respectivement pour le peroxy ABAP et le t-BHP).

Le t-BHP n'affecte pas la contraction phasique induite par le KCl ou le BaCl₂, mais il diminue la contraction tonique suggérant que le t-BHP n'a pas d'effet sur les canaux calciques de type L. Cependant, il est rapporté que les canaux calciques voltage-dépendants sont inhibés par les radicaux libres et les oxydants (hydroperoxyde de cumène, H₂O₂) (Kourie, 1998).

Contrairement au t-BHP, les contractions phasiques et toniques induites par le KCl et le BaCl₂ sont augmentées par le traitement des bandelettes longitudinales de l'iléon avec le peroxy ABAP, suggérant que le tissu dispose du Ca²⁺ nécessaire à la contraction du muscle lisse. C'est

uniquement en présence d'une concentration élevée de peroxy ABAP (196 μM) que le KCl ou le BaCl_2 induisent une contraction phasique même lorsque les canaux calciques sont bloqués par le vérapamil. Le calcium mobilisé dans cette contraction proviendrait alors des réserves intracellulaires. En effet, il a été montré que les espèces réactives de l'oxygène activent les canaux-récepteurs de la ryanodine du réticulum sarcoplasmique, libérant ainsi les ions calcium (Cao et al., 2005).

Conclusions et perspectives

Les bandelettes longitudinales de l'iléon de lapin génèrent une activité spontanée reproductible sous forme de contractions phasiques.

Nos résultats montrent que les radicaux peroxy issus de la décomposition thermique de l'ABAP induisent une réponse biphasique: un silence suivi par une reprise des contractions phasiques. Le silence observé est dû dans sa totalité à l'ABAP non décomposé; mais sa durée peut être prolongée par les radicaux peroxy. L'atropine 1 μM et l'hexaméthonium 100 μM et la lidocaïne 100 μM diminuent la durée du silence, confirmant que la transmission cholinergique et la propagation du potentiel d'action sont impliquées dans l'inhibition de la contraction spontanée par l'ABAP en premier lieu, et peut être par le peroxy ABAP. Le peroxy ABAP induit l'arrêt des contractions phasiques en interférant avec les canaux K_{ca} . Les contractions phasiques qui suivent la période de silence dépendent de l'entrée du calcium extracellulaire par les canaux calciques de type L et de la libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires.

La quinacrine diminue la durée du silence induite par le peroxy ABAP, suggérant que l'arrêt des contractions pourrait résulter de l'activation de la PLA_2 qui libère l'acide arachidonique, ce dernier est transformé, au cours du temps, en leucotriènes qui peuvent expliquer la reprise des contractions. La voie de la cyclooxygénase n'est probablement pas importante.

L'effet contractile du vanadate est contrarié par l'ABAP à cause de l'inhibition probable de la phosphorylation des protéines kinase et/ou l'activation des protéines phosphatases.

L'addition cumulée de t-BHP induit une diminution du tonus de repos et de l'amplitude des contractions spontanées de manière dépendante de la concentration. Cet effet peut être dû à l'activation des canaux potassiques.

Le peroxy ABAP ne modifie pas les contractions phasiques induites par la stimulation électrique, écartant ainsi une interférence possible avec la transmission nerveuse ou l'activation des récepteurs muscariniques. L'absence d'effet du peroxy ABAP et du t-BHP sur les récepteurs muscariniques est vérifié par la réponse du muscle lisse au carbachol qui reste inchangée.

Le t-BHP n'affecte pas la contraction phasique induite par le KCl ou le BaCl_2 ; mais il diminue la contraction tonique, indiquant que le t-BHP n'a pas d'effet sur les canaux calciques de type L. Le KCl ou le BaCl_2 induisent une contraction phasique même lorsque les canaux calciques sont bloqués par le vérapamil et cela uniquement en présence du peroxy ABAP (196 μM), indiquant que le calcium utilisé dans cette contraction proviendrait des réserves intracellulaires.

Les divers aspects abordés dans cette étude ouvrent de nouvelles perspectives d'étude des effets du stress oxydatif sur la motilité intestinale. Il serait intéressant d'étudier l'interférence de

peroxyl ABAP avec l'activité des kinases et des phosphatases en utilisant des inhibiteurs spécifique de ces enzymes. La mobilisation du calcium intracellulaire est aussi une voie d'investigation quant aux effets des radicaux libres sur la motilité spontanée du muscle lisse de l'intestin. La libération possible de l'acide arachidonique par le stress oxydatif et de ses effets au cours de temps méritent une attention particulière à cause de son rapprochement des processus inflammatoires.

Références

bibliographiques

- 1- Afshin S., Keshavarz M., Salami M., Mirershadi F. and Djahanguiri B. Effect of indomethacin on electrical field stimulation-induced contractions of isolated transverse and longitudinal rat gastric fundus strips. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5358-5361.
- 2- Agnès C., Breton B., Koumanov K., Béréziat G. and Colard O. Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C1040-C1046.
- 3- Alberti E. and Jimenez M. Effect of 4-aminopyridine (4-AP) on the spontaneous activity and neuromuscular junction in the rat colon. *Pharmacol Res* 2005; 52: 447-456.
- 4- Alberti E., Mikkelsen H. B., Larsen J. O. and Jimenez M. Motility patterns and distribution of interstitial cells of Cajal and nitrergic neurons in the proximal, mid- and distal-colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 133-147.
- 5- Alberti E., Mikkelsen H. B., Wang X. Y., Diaz M., Larsen J. O., Huizinga J. D. and Jimenez M. Pacemaker activity and inhibitory neurotransmission in the colon of Ws/Ws mutant rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1499-G1510.
- 6- Alcon S., Camello P. J., Garcia L. J. and Pozo M. J. Activation of tyrosine kinase pathway by vanadate in gallbladder smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1077-1089.
- 7- Alcon S., Morales S., Camello P. J., Hemming J. M., Jennings L., Mawe G. M. and Pozo M. J. A redox-based mechanism for the contractile and relaxing effects of NO in the guinea-pig gall bladder. *J Physiol* 2001; 532: 793-810.
- 8- Aruoma O. I., Smith C., Cecchini R., Evans P. J. and Halliwell B. Free radical scavenging and inhibition of lipid peroxidation by beta-blockers and by agents that interfere with calcium metabolism. A physiologically-significant process? *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 735-743.
- 9- Asmus KD and Bonifacic M. Free radical chemistry. In: *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*, edited by Sen CK, Packer L and Haninnen O. Elsevier Science, Amsterdam, 2000, p. 3-54.
- 10- Baldassano S., Serio R. and Mulè F. Cannabinoid CB(1) receptor activation modulates spontaneous contractile activity in mouse ileal longitudinal muscle. *Eur J Pharmacol* 2008; 582: 132-138.
- 11- Balemba O. B., Salter M. J., Heppner T. J., Bonev A. D., Nelson M. T. and Mawe G. M. Spontaneous electrical rhythmicity and the role of the sarcoplasmic reticulum in the excitability of guinea pig gallbladder smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: 655-664.
- 12- Barlow R. S., El-Mowafy A. M. and White R. E. H₂O₂ opens BK(Ca²⁺) channels via the PLA(2)-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H475-H483.
- 13- Barlow R. S. and White R. E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol* 1998; 275: H1283-H1289.
- 14- Bauer V., Holzer P. and Ito Y. Role of extra- and intracellular calcium in the contractile action of agonists in the guinea-pig ileum. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1991; 343: 58-64.
- 15-
- 16- Bauer V., Nakajima T., Pucovsky V., Onoue H. and Ito Y. Effects of superoxide generating systems on muscle tone, cholinergic and NANC responses in cat airway. *J Auton Nerv Syst* 2000; 79: 34-44.
- 17- Bauer V., Sotnikova R., Machova J., Matyas S., Pucovsky V. and Stefek M. Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine, vessels and airways and the effect of antioxidants. *Life Sci* 1999; 65: 1909-1917.
- 18- Bellomo G., Jewell S. A., Thor H. and Orrenius S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: studies with isolated hepatocytes and t-butyl hydroperoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 6842-6846.
- 19- Benabdallah H., Messaoudi D. and Gharzouli K. The spontaneous mechanical activity of the circular smooth muscle of the rabbit colon in vitro. *Pharmacol Res* 2008; 57: 132-141.

- 20- Benko R., Lazar Z., Undi S., Illenyi L., Antal A., Horvath O. P., Rumbus Z., Wolf M., Maggi C. A. and Bartho L. Inhibition of nitric oxide synthesis blocks the inhibitory response to capsaicin in intestinal circular muscle preparations from different species. *Life Sci* 2005; 76: 2773-2782.
- 21- Benko R., Undi S., Wolf M., Magyar K., Tovolgyi Z., Rumbus Z. and Bartho L. P(2) purinoceptors account for the non-nitroergic NANC relaxation in the rat ileum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006. Article in press
- 22- Bennett A., Hensby C. N., Sanger G. J. and Stamford I. F. Metabolites of arachidonic acid formed by human gastrointestinal tissues and their actions on the muscle layers. *Br J Pharmacol* 1981; 74: 435-444.
- 23- Benton D. C. H., Roxborough C. J., Ganelline C. R., Shiner M. A. R. and Jenkinson D. H. Differences in the actions of some blockers of the calcium-activated potassium permeability in mammalian red cells. *Brit J Pharmacol* 1999; 126: 169-178.
- 24- Bergamini C. M., Gambetti S., Dondi A. and Cervellati C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. *Curr Pharm Desing* 2004; 10: 1611-1626.
- 25- Bergendi L., Benes L., Durackova Z. and Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865-1874.
- 26- Bhardwaj P. Oxidative stress and antioxidants in gastrointestinal diseases. *Topical Gastroenterology* 2008; 29: 129-135.
- 27- Bielfeldt K. and Conklin J. L. Intestinal motility during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 878-884.
- 28- Blackshaw L. A. and Gebhart G. F. The pharmacology of gastrointestinal nociceptive pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 642-648.
- 29- Boddy G. and Daniel E. E. L-Ca²⁺ channels in intestinal pacing in wild-type and W/WV mice. *Am J Physiol* 2005; 288: G439-G446.
- 30- Borjesson L., Nordgren S. and Delbro D. DMPP causes relaxation of rat distal colon by a purinergic and a nitroergic mechanism. *Eur J Pharmacol* 1997; 344: 223-231.
- 31- Buharalioglu C. K. and Akar F. The reactivity of serotonin, acetylcholine and KCl-induced contractions to relaxant agents in the rat gastric fundus. *Pharmacol Res* 2002; 45: 325-331.
- 32- Bush T. G., Spencer N. J., Watters N., Sanders K. M. and Smith T. K. Spontaneous migrating motor complexes occur in both the terminal ileum and colon of the C57BL/6 mouse in vitro. *Auton Neurosci* 2000; 84: 162-168.
- 33- Bywater R. A., Small R. C. and Taylor G. S. Neurogenic slow depolarizations and rapid oscillations in the membrane potential of circular muscle of mouse colon. *J Physiol* 1989; 413: 505-519.
- 34- Bywater R. A., Spencer N. J., Fida R. and Taylor G. S. Second-, minute- and hour-metronomes of intestinal pacemakers. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; 25: 857-861.
- 35- Campbell W. B., Spitzbarth N., Gauthier K. M. and Pfister S. L. 11,12,15-Trihydroxyeicosatrienoic acid mediates ACh-induced relaxations in rabbit aorta. *Am J Physiol* 2003; 285: H2648-H2656.
- 36- Candura S. M., Manzo L., Marraccini P., Coccini T. and Tonini M. Investigation into vanadate-induced potentiation of smooth muscle contractility in the rabbit isolated ileum. *Life Sci* 1994; 54: 237-244.
- 37- Cane A., Breton B., Koumanov K., Bereziat G. and Colard O. Oxidant-induced arachidonic acid release and impairment of fatty acid acylation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 274: C1040-C1046.
- 38- Cao W., Harnett K. M., Cheng L., Kirber M. T., Behar J. and Biancani P. H₂O₂: a mediator of esophagitis-induced damage to calcium-release mechanisms in cat lower esophageal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G1170-G1178.

- 39- Cao W., Vrees M. D., Kirber M. T., Fiocchi C. and Pricolo V. E. Hydrogen peroxide contributes to motor dysfunction in ulcerative colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G833-G843.
- 40- Carl A., Bayguinov O., Shuttleworth C. W., Ward S. M. and Sanders K. M. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in electrical activity of longitudinal and circular muscle layers of canine colon. *Am J Physiol* 1995; 268: C619-C627.
- 41- Carnicelli V., Di G. A., Romano G., Bozzi A., Oratore A., Delle F. G., Strom R. and Severi C. Regional differences in signalling transduction pathways among smooth muscle cells from rabbit colon. *Cell Signal* 2000; 12: 683-689.
- 42- Castle N. A. Recent advances in the biology of the small conductance calcium activated-potassium channels. *Perspect Drug Discov and Design* 1999; 15: 131-154.
- 43- Chetty N., Irving H. R. and Coupar I. M. Activation of 5-HT₃ receptors in the rat and mouse intestinal tract: a comparative study. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 1012-1021.
- 44- Comhair S. A. A. and Erzurum S. C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 283: L246-L255.
- 45- Costa M., Brookes S. J. H., Steele P. A., Gibbins I., Burcher E. and Kandiah C. H. Neurochemical classification of myenteric neurons. *Neuroscience* 1996; 75: 949-967.
- 46- Criswell K. A. and Loch-Carusio R. Lindane-induced inhibition of spontaneous contractions of pregnant rat uterus. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 481-490.
- 47- Dai Y., Liu J. X., Li J. X. and Xu Y. F. Effect of pinaverium bromide on stress-induced colonic smooth muscle contractility disorder in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 557-561.
- 48- Daniel E. E., Boddy G., Bong A. and Cho W. A new model of pacing in the mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 253-262.
- 49- Daniel E. E., Kwan C. Y. and Janssen J. Pharmacological techniques for the in vitro study of intestinal smooth muscles. *J Pharmacol Toxicol* 2001; 45: 141-158.
- 50- Datte J. Y., Ziegler A. and Tillement J. P. Sympathomimetic effects of *Parquetina nigrescens* (Periplocaceae) extract in isolated portal vein smooth muscle. *Gen Pharmacol* 1999; 32: 551-556.
- 51- De Jongh R., Haenen G. R., van Koeveringe G. A., Dambros M., De Mey J. G. and van Kerrebroeck P. E. Oxidative stress reduces the muscarinic receptor function in the urinary bladder. *Neurourol Urodyn* 2007; 26: 302-308.
- 52- De Jongh R., Haenen G. R., van Koeveringe G. A., Dambros M. and van Kerrebroeck P. E. Lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal contributes to bladder smooth muscle damage. *Urology* 2008. Article in press
- 53- De Ponti F., Modini C., Gibelli G., Crema F. and Frigo G. Atypical beta-adrenoceptors mediating relaxation in the human colon: functional evidence for beta₃-rather than beta₄-adrenoceptors. *Pharmacol Res* 1999; 39: 345-348.
- 54- Di Salvo J., Semenchuk L. A. and Lauer J. Vanadate-induced contraction of smooth muscle and enhanced protein tyrosine phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1993; 304: 386-391.
- 55- Dickens E. J., Hirst G. D. S. and Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999; 514: 515-531.
- 56- Dong D. L., Wang Q. H., Chen W., Fan J. J., Mu J. W., Ke J. and Yang B. F. Contrasting effects of tetraethylammonium and 4-aminopyridine on the gastrointestinal function of mice. *Eur J Pharmacol* 2005; 509: 179-185.
- 57- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.

- 58- Ehlert F. J. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sci* 2003; 74: 355-366.
- 59- El-Yazbi A. F., Schulz R. and Daniel E. E. Differential inhibitory control of circular and longitudinal smooth muscle layers of Balb/C mouse small intestine. *Auton Neurosci* 2007; 131: 36-44.
- 60- Espanol A. J. and Sales M. E. Participation of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in the signal transduction pathway of ileal muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Res* 2000; 42: 489-493.
- 61- Fang Y. Z., Yang S. and Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
- 62- Flynn E. R., McManus C. A., Bradley K. K., Koh S. D., Hegarty T. M., Horowitz B. and Sanders K. M. Inward rectifier potassium conductance regulates membrane potential of canine colonic smooth muscle. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 247-256.
- 63- Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893: 13-18.
- 64- Fujimoto S., Mori M., Tsushima H. and Kunitatsu M. Capsaicin-induced, capsazepine-insensitive relaxation of the guinea-pig ileum. *Eur J Pharmacol* 2006; 530: 144-151.
- 65- Furness JB. The enteric nervous system. Blackwell Publishing, Victoria, Australia, 2006, pp 1-200.
- 66- Furness J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 87-96.
- 67- Furness J. B., Jones C., Nurgali K. and Clerc N. Intrinsic primary afferent neurons and nerve circuits within the intestine. *Prog Neurobiol* 2004; 72: 143-164.
- 68- Furness J. and Sanger G. Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 612-622.
- 69- Fusi F., Valoti M., Petkov G. V., Boev K. K. and Sgaragli G. P. Myorelaxant activity of 2-t-butyl-4-methoxyphenol
- 70- Gesquiere L., Loreau N. and Blache D. role of the cyclic amp-dependent pathway in free radicalinduced cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2000; 29: 181-190.
- 71- Gilani A. H., Khan A. U., Raoof M., Ghayur M. N., Siddiqui B. S., Vohra W. and Begum S. Gastrointestinal, selective airways and urinary bladder relaxant effects of *Hyoscyamus niger* are mediated through dual blockade of muscarinic receptors and Ca²⁺ channels. *Fundam Clin Pharmacol* 2008; 22: 87-99.
- 72- Gonzalez A. and Sarna S. K. Different types of contractions in rat colon and their modulation by oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001a; 280: G546-G554.
- 73- Gonzalez A. and Sarna S. K. Neural regulation of in vitro giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001b; 281: G275-G282.
- 74- Goyal R. K. and He X. D. Evidence for NO. redox form of nitric oxide as nitrergic inhibitory neurotransmitter in gut. *Am J Physiol* 1998; 275: G1185-G1192.
- 75- Grasa L., Arruebo M. P., Plaza M. A. and Murillo M. D. The role of tyrosine kinase in prostaglandin E2 and vanadate-evoked contractions in rabbit duodenum in vitro. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 279-289.
- 76- Grasa L., Rebolgar E., Arruebo M. P., Plaza M. A. and Murillo M. D. The role of Ca²⁺ in the contractility of rabbit small intestine in vitro. *J Physiol Pharmacol* 2004; 55: 639-650.
- 77- Grasa L., Rebolgar E., Arruebo M. P., Plaza M. A. and Murillo M. D. The role of NO in the contractility of rabbit small intestine in vitro: effect of K⁺ channels. *J Physiol Pharmacol* 2005; 56: 407-419.
- 78- Grider J. R. Reciprocal activity of longitudinal and circular muscle during intestinal peristaltic reflex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G768-G775.

- 79- Grover A. K., Samson S. E., Misquitta C. M. and Elmoselhi A. B. Effects of peroxide on contractility of coronary artery rings of different sizes. *Mol Cell Biochem* 1999; 194: 159-164.
- 80- Gwynne R. M., Thomas E. A., Goh S. M., Sjøvall H. and Bornstein J. C. Segmentation induced by intraluminal fatty acid in isolated guinea-pig duodenum and jejunum. *J Physiol* 2004; 556: 557-569.
- 81- Harnett K. M., Cao W. and Biancani P. Signal-transduction pathways that regulate smooth muscle function I. Signal transduction in phasic (esophageal) and tonic (gastroesophageal sphincter) smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G407-G416.
- 82- Hashitani H., Fukuta H., Takano H., Klemm M. F. and Suzuki H. Origin and propagation of spontaneous excitation in smooth muscle of the guinea pig urinary bladder. *J Physiol (London)* 2001; 530: 273-286.
- 83- Hasler WL. Small intestine motility. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, edited by Johnson LR. Elsevier Academic Press, Oxford, 2006, p. 935-964.
- 84- Hoffmann P., Stanke-Labesque F., Fanchin R., Dilai N., Pons J. C. and Ayoubi J. M. Effects of L-arginine and sodium nitroprusside on the spontaneous contractility of human non-pregnant uterus. *Hum Reprod* 2003; 18: 148-151.
- 85- Holzer P. and Holzer-Petsche U. Tachykinin receptors in the gut: physiological and pathological implications. *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 1: 583-590.
- 86- Huang J., Zhou H., Mahavadi S., Sriwai W., Lyall V. and Murthy K. S. Signaling pathways mediating gastrointestinal smooth muscle contraction and MLC20 phosphorylation by motilin receptors. *Am J Physiol* 2005; 288: G23-G31.
- 87- Huizinga J. D., Faraway L. and Den H. A. Generation of slow-wave-type action potentials in canine colon smooth muscle involves a non-L-type Ca²⁺ conductance. *J Physiol* 1991; 442: 15-29.
- 88- Huizinga J. D. and Lammers W. J. Gut peristalsis is governed by a multitude of cooperating mechanisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1-G8.
- 89- Ieiri S., Nishimura K., Hirano K., Suita S. and Kanaide H. The mechanism for the contraction induced by leukotriene C₄ in guinea-pig taenia coli. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 529-538.
- 90- Ignarro L. J., Cirino G., Casini A. and Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999; 34: 879-886.
- 91- Imai T., Okamoto T., Yamamoto Y., Tanaka H., Koike K., Shigenobu K. and Tanaka Y. Effects of different types of K⁺ channel modulators on the spontaneous myogenic contraction of guinea-pig urinary bladder smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 2001; 173: 323-333.
- 92- Ishihara Y., Sekine M., Hatano A. and Shimamoto N. Sustained contraction and endothelial dysfunction induced by reactive oxygen species in porcine coronary artery. *Biol Pharm Bull* 2008; 31: 1667-1672.
- 93- Itoh S., Yanagishita T., Aoki S., Koba S., Iwata T., Ishioka H., Arata H., Mukae S., Geshi E., Konno N., Katagiri T. and Utsumi H. Generation of free radicals and the damage done to the sarcoplasmic reticulum during reperfusion injury following brief ischemia in the canine heart. *Jpn Circ J* 1999; 63: 373-378.
- 94- Jiang H. H., Song B., Lu G. S., Wen Q. J. and Jin X. Y. Loss of ryanodine receptor calcium-release channel expression associated with overactive urinary bladder smooth muscle contractions in a detrusor instability model. *BJU Int* 2005; 96: 428-433.
- 95- Jin X., Morsy N., Shoeb F., Zavzavadjian J. and Akbarali H. I. Coupling of M₂ muscarinic receptor to L-type Ca²⁺ channel via c-src kinase in rabbit colonic circular smooth muscle. *Gastroenterology* 2002; 123: 827-834.
- 96- Joiner W. J., Basavappa S., Vidyasagar S., Nehrke K., Krishnan S., Binder H. J., Boulpaep E. L. and Rajendran V. M. Active K⁺ secretion through multiple KCa-type channels and regulation by IKCa channels in rat proximal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G185-G196.
- 97- Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295: C849-C868.

- 98- Josephson I. and Sperelakis N. Local anesthetic blockade of Ca²⁺ -mediated action potentials in cardiac muscle. *Eur J Pharmacol* 1976; 4: 201-208.
- 99- Kadinov B., Itzev D., Gagov H., Christova T., Bolton T. B. and Duridanova D. Induction of heme oxygenase in guinea-pig stomach: roles in contraction and in single muscle cell ionic currents. *Acta Physiol Scand* 2002; 175: 297-313.
- 100- Kang M. Y., Tsuchiya M., Packer L. and Manabe M. In vitro study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42: 4-12.
- 101- Karak H., Satake N. and Shibata S. Mechanism of barium-induced contraction in the vascular smooth muscle of rabbit aorta. *Brit J Pharmacol* 1986; 88: 821-826.
- 102- Kilbinger H., Farrokh A., Honenfellner M. and Mang C. F. Nitroergic modulation of acetylcholine release in the enteric nervous system: differences between guinea-pig and man. *Inflammopharmacology* 2002; 10: 461-469.
- 103- Kinoshita H., Kimoto Y., Nakahata K., Iranami H., Dojo M. and Hatano Y. The role of K⁺ channels in vasorelaxation induced by hypoxia and the modulator effects of lidocaine in the rat carotid artery. *Anesth Analg* 2003; 97: 333-8, table.
- 104- Kishi M., Takeuchi T., Katayama H., Yamazaki Y., Nishio H., Hata F. and Takewaki T. Involvement of cyclic AMP-PKA pathway in VIP-induced, charybdotoxin-sensitive relaxation of longitudinal muscle of the distal colon of Wistar-ST rats. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 140-146.
- 105- Kitazawa T., Onodera C. and Taneike T. Potentiation of motilin-induced contraction by nitric oxide synthase inhibition in the isolated chicken gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 3-13.
- 106- Kito Y., Ward S. M. and Sanders K. M. Pacemaker potentials generated by interstitial cells of Cajal in the murine intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C710-C720.
- 107- Kobil T., Szurszewski J. H., Farrugia G. and Hanani M. Coupling and innervation patterns of interstitial cells of Cajal in the deep muscular plexus of the guinea-pig. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 641.
- 108- Kohen R. and Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650.
- 109- Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 2004; 11: 1041-1064.
- 110- Korn S. J. and Horne R. Nordihydroguaiaretic acid inhibits voltage-activated Ca²⁺ currents independently of lipoxigenase inhibition. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 524-530.
- 111- Kourie J. I. Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998; 275: 1-24.
- 112- Koyluoglu G., Bagcivan I., Karadas B., Guney C., Durmus N., Altune A. and Kaya T. Alterations in spontaneous contractions of rat ileum and jejunum after peritonitis. *Eur J Pharmacol* 2008; 580: 250-255.
- 113- Kunze W. A., Clerc N., Bertrand P. P. and Furness J. B. Contractile activity in intestinal muscle evokes action potential discharge in guinea-pig myenteric neurons. *J Physiol* 1999; 517: 547-561.
- 114- Kuriyama H., Kitamura K. and Inoue R. Physiological features of visceral smooth muscle cells, with special reference to receptors and ion channels. *Physiol Rev* 1998; 78: 812-920.
- 115- Lamarca V., Grasa L., Fagundes D. S., Arruebo M. P., Plaza M. A. and Murillo M. D. K⁺ channels involved in contractility of rabbit small intestine. *J Physiol Biochem* 2006; 62: 227-236.
- 116- Langheinrich U. and Daut J. Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K⁺ channel openers and glucose deprivation. *J Physiol* 1997; 502 (Pt 2): 397-408.
- 117- Lecci A., Santicioli P. and Maggi C. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 630-641.

- 118- Lee S. H., Hwang T. H. and Jung J. S. Differential actions of AIF and vanadate on canine trachealis muscle. *Pflugers Arch* 1994; 427: 295-300.
- 119- Li J., Li W., Liu W., Altura B. T. and Altura B. M. Mechanisms of hydroxyl radical-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol* 2004; 499: 171-178.
- 120- Li S. Y., Huang B. B. and Ouyang S. Effect of genistein on voltage-gated potassium channels in guinea pig proximal colon smooth muscle cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 420-425.
- 121- Liu Y. and Gutterman D. D. Oxidative stress and potassium channel function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 305-311.
- 122- Lomax A. E. and Furness J. B. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res* 2000; 302: 59-72.
- 123- Lorenz J. N., Schnermann J., Brosius F. C., Briggs J. P. and Furspan P. B. Intracellular ATP can regulate afferent arteriolar tone via ATP-sensitive K⁺ channels in the rabbit. *J Clin Invest* 1992; 90: 733-740.
- 124- Ma T., Qi Q. H., Yang W. X., Xu J. and Dong Z. L. Contractile effects and intracellular Ca²⁺ signalling induced by emodin in circular smooth muscle cells of rat colon. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1804-1807.
- 125- Magalhaes P. J., Lahlou S. and Leal-Cardoso J. H. Antispasmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* on guinea-pig ileum: a myogenic activity. *Fundam Clin Pharmacol* 2004; 18: 539-546.
- 126- Makhlof GM and Murthy KS. Cellular Physiology of Gastrointestinal Smooth Muscle. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, edited by Johnson LR. Elsevier Academic Press, Oxford, 2006, p. 524-531.
- 127- Mang C. F., Truempler S., Erbeling D. and Kilbinger H. Modulation by NO of acetylcholine release in the ileum of wild-type and NOS gene knockout mice. *Am J Physiol* 2002; 283: G1132-G1138.
- 128- Marathe G. K., Yousufzai S. Y. and Abdel-Latif A. A. Mediation by prostaglandins of the stimulatory effect of substance P on cyclic AMP production in dog iris sphincter smooth muscle. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1261-1269.
- 129- Martinez-Cayuela M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 1995; 77: 147-161.
- 130- Mates J. M., Perez-Gomez C. and De Castro I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
- 131- Matsumoto H., Kamm K. E., Stull J. T. and Azuma H. Delphinidin-3-rutinoside relaxes the bovine ciliary smooth muscle through activation of ETB receptor and NO/cGMP pathway. *Exp Eye Res* 2005; 80: 313-322.
- 132- Matyas S., Pucovsky V. and Bauer V. Effects of Various Reactive Oxygen Species on the Guinea Pig Trachea and Its Epithelium. *Jpn J Pharmacol* 2002; 88: 270-278.
- 133- McCarron J. G., Craig J. W., Bradley K. N. and Muir T. C. Agonist-induced phasic and tonic responses in smooth muscle are mediated by Ins P₃. *J Cell Sci* 2002; 115: 2207-2218.
- 134- McCord J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 108: 652-659.
- 135- Metzeler DE. Coenzymes of oxidation–reduction reactions. In: *Biochemistry: The chemical reaction of living cells*, edited by Metzeler DE. Academic Press, New York, 2003, pp. 765-836.
- 136- Mitsui R., Karaki S. I., Kubo Y., Sugiura Y. and Kuwahara A. Fibre-free diet leads to impairment of neuronally mediated muscle contractile response in rat distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 1093-1101.
- 137- Morales S., Camello P. J., Mawe G. and Pozo M. J. Characterization of intracellular Ca²⁺ stores in gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol* 2005; 288: G507-G513.

- 138- Moreels T. G., De Man J. G., Dick J. M., Nieuwendijk R. J., De Winter B. Y., Lefebvre R. A., Herman A. G. and Pelckmans P. A. Effect of TNBS-induced morphological changes on pharmacological contractility of the rat ileum. *Eur J Pharmacol* 2001; 423: 211-222.
- 139- Mori M. and Tsushima H. Vanadate activates Rho A translocation in association with contracting effects in ileal longitudinal smooth muscle of guinea pig. *J Pharmacol Sci* 2004; 95: 443-451.
- 140- Moumni C., Gullikson G. W., Grisham M. B. and Gaginella T. S. Differential effects of reactive oxygen metabolites on neurally stimulated and nonstimulated guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 266-271.
- 141- Mulè F., D'Angelo S., Amato A., Contino I. and Serio R. Modulation by nitric oxide of spontaneous mechanical activity in rat proximal colon. *J Auton Pharmacol* 1999a; 19: 1-6.
- 142- Mulè F., D'Angelo S. and Serio R. Tonic inhibitory action by nitric oxide on spontaneous mechanical activity in rat proximal colon: involvement of cyclic GMP and apamin-sensitive K⁺ channels. *Br J Pharmacol* 1999b; 127: 514-520.
- 143- Mulè F., D'Angelo S., Tabacchi G., Amato A. and Serio R. Mechanical activity of small and large intestine in normal and mdx mice: a comparative analysis. *Neurogastroenterol Motil* 1999c; 11: 133-139.
- 144- Mulè F. and Serio R. Increased calcium influx is responsible for the sustained mechanical tone in colon from dystrophic (mdx) mice. *Gastroenterology* 2001; 120: 1430-1437.
- 145- Murillo M. D., Plaza M. A. and Arruebo M. P. The effect of Mn²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺ and Ca²⁺ on spontaneous motility in sheep duodenum in vitro. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 65-71.
- 146- Murthy K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 345-374.
- 147- Nagano N., Imaizumi Y., Hirano M. and Watanabe M. Opening of Ca⁽²⁺⁾-dependent K⁺ channels by nordihydroguaiaretic acid in porcine coronary arterial smooth muscle cells. *Jpn J Pharmacol* 1996; 70: 281-284.
- 148- Nakayama S., Ito Y., Sato S., Kamijo A., Liu H. N. and Kajioka S. Tyrosine kinase inhibitors and ATP modulate the conversion of smooth muscle L-type Ca²⁺ channels toward a second open state. *FASEB J* 2006; 20: 1492-1494.
- 149- Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Method Enzymol* 1999; 186: 100-108.
- 150- Ohta T., Yasuda W., Hasegawa A., Ito S. and Nakazato Y. Effects of inhibitors for tyrosine kinase and non-selective cation channel on capacitative Ca²⁺ entry in rat ileal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: 211-220.
- 151- Olsson C. and Holmgren S. PACAP and nitric oxide inhibit contractions in the proximal intestine of the atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Exp Biol* 2000; 203 Pt 3:575-83.: 575-583.
- 152- Olsson C. and Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 2001; 128: 481-503.
- 153- Ostrom R. S. and Ehlert F. J. M2 muscarinic receptor inhibition of agonist-induced cyclic adenosine monophosphate accumulation and relaxation in the guinea pig ileum. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 189-199.
- 154- Parkman H. P., Pagano A. P. and Ryan J. P. PACAP and VIP inhibit pyloric muscle through VIP/PACAP-preferring receptors. *Regul Pept* 1997; 71: 185-190.
- 155- Peluso I., Campolongo P., Valeri P., Romanelli L. and Palmery M. Intestinal motility disorder induced by free radicals: A new model mimicking oxidative stress in gut. *Pharmacol Res* 2002; 46: 533-538.

- 156- Percy W. H., Lee S. Y., Burton M. B., Tolentino T. and Burakoff R. Leukotriene D4 excitation of rabbit distal colon arises in the region of the muscularis mucosae. *Am J Physiol* 1990; 259: G753-G759.
- 157- Petkov G. V., Spassov G. D. and Boev K. K. Role of sarcoplasmic reticulum in the myorelaxant activity of nitric oxide donors in guinea pig gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1998; 354: 59-66.
- 158- Piepoli A. L., De S. G., De Salvia M. A., Mitolo C. I., Siro-Brigiani G., Marzullo A., Grattagliano I., Mitolo-Chieppa D., Palasciano G. and Portincasa P. Indomethacin-induced ileitis is associated with tensiometric, vascular and oxidative changes in the experimental rat model. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 271-278.
- 159- Pluja L., Fernandez E. and Jimenez M. Electrical and mechanical effects of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide in the rat colon involve different mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2000; 389: 217-224.
- 160- Poole D. P. and Furness J. B. PKC delta-isoform translocation and enhancement of tonic contractions of gastrointestinal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G887-G898.
- 161- Pou S., Pou S. W., Bredt D. S., Snyder S. H. and Rosen G. M. Generation of Superoxide by Purified Brain Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem* 1992; 267: 24173-24176.
- 162- Pourmahram G. E., Snetkov V. A., Shayfta Y., Drndarski S., Knock G. A., Aaronson P. I. and Ward J. P. Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of Ca²⁺ release and PKC. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 1468-1476.
- 163- Powell A. K., Fida R. and Bywater R. A. Motility in the isolated mouse colon: migrating motor complexes, myoelectric complexes and pressure waves. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 257-266.
- 164- Prasad K. and Gupta J. B. Relaxant effect of oxygen free radicals on rabbit tracheal smooth muscle. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 2002; 15: 375-384.
- 165- Prasad M., Matthews J. B., He X. D. and Akbarali H. I. Monochloramine directly modulates Ca²⁺-activated K⁺ channels in rabbit colonic muscularis mucosae. *Gastroenterology* 1999; 117: 906-917.
- 166- Quinn T., Feighery R. and Baird A. W. Role of Rho-kinase in guinea-pig gallbladder smooth muscle contraction. *Eur J Pharmacol* 2006; 534: 210-217.
- 167- Rekalov V., Juranek I., Gurkovskaya A., Shuba M. and Bauer V. The effects of H₂O₂ on electromechanical activity of the ileum longitudinal muscle. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 151-166.
- 168- Rogers P. A., Dick G. M., Knudson J. D., focardi M., Bartz I. N., Swafford A. N., Saitoh S., Tune J. D. and Chilian W. M. H₂O₂-induced redox-sensitive coronary vasodilation is mediated by 4-aminopyridine-sensitive K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2473-H2482.
- 169- Romanelli L., Amico M. C., Palmery M., Peluso I., Savini G., Tucci P. and Valeri P. Role of the cholinergic system and of apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels on rabbit jejunum spontaneous activity and on the inhibitory effects of adrenoceptor agonists. *Auton Autacoid Pharmacol* 2003; 23: 105-115.
- 170- Saito M., Watanabe Y. and Itoh T. Mechanism underlying H₂O₂-induced inhibition of acetylcholine-induced contraction in rabbit tracheal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2007; 577: 195-203.
- 171- Sales M. E., Sterin-Borda L., Rodriguez M. and Borda E. S. Intracellular signals coupled to different rat ileal muscarinic receptor subtypes. *Cell Signal* 1997; 9: 373-378.
- 172- Sanders K. M. Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1438-1449.
- 173- Sanders K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1: 39-53.
- 174- Sarna S. K. Molecular, functional, and pharmacological targets for the development of gut promotility drugs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G545-G555.

- 175- Sarna S. K. In vivo signal-transduction pathways to stimulate phasic contractions in normal and inflamed ileum. *Am J Physiol* 1998; 274: G618-G625.
- 176- Satoh T., Inatomi N., Satoh H., Marui S., Itoh Z. and Omura S. EM-523, an erythromycin derivative, and motilin show similar contractile activity in isolated rabbit intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 940-944.
- 177- Sawyer G. W., Lambrecht G. and Ehlert F. J. Functional role of muscarinic M(2) receptors in alpha,beta-methylene ATP induced, neurogenic contractions in guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1458-1464.
- 178- Setoguchi H., Nishimura J., Hirano K., Takahashi S. and Kanaide H. Leukotriene C(4) enhances the contraction of porcine tracheal smooth muscle through the activation of Y-27632, a rho kinase inhibitor, sensitive pathway. *Br J Pharmacol* 2001; 132: 111-118.
- 179- Sevcencu C., Pennisi C. P., Yoshida K. and Gregersen H. Simultaneous monitoring of cellular depolarization and contraction: a new method to investigate excitability and contractility in isolated smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294: G648-G654.
- 180- Sgaragli G. P., Valoti M., Gorelli B., Fusi F., Palmi M. and Mantovani P. Calcium antagonist and antiperoxidant properties of some hindered phenols. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 369-377.
- 181- Shafer S. H., Phelps S. H. and Williams C. L. Reduced DNA synthesis and cell viability in small cell lung carcinoma by treatment with cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 1229-1236.
- 182- Shahbazian A. Physiological and pharmacological regulation of intestinal peristalsis: the role of opioids and cyclooxygenase products (Dissertation). Karl Franzens university of Graz , Austria: Department of Experimental and Clinical Pharmacology & Division of Neurobiology, 2002.
- 183- Shi X. Z. and Sarna S. K. Differential inflammatory modulation of canine ileal longitudinal and circular muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 277: G341-G350.
- 184- Shieh C. C., Coghlan M. J., Sullivan J. P. and Copalakrishnan M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 557-593.
- 185- Shimamura K. and Sunano S. Effects of sodium vanadate on the smooth muscle of the rat portal vein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 337: 347-353.
- 186- Shin J. H., Lee J. E., Park J. M. and Suh C. K. T-butyl hydrogen peroxide increases the activities of the Maxi-K channels of rat brain. *Life Sci* 2000; 67: 2485-2491.
- 187-
- 188- Sim J. H., Kim Y. C., Kim S. J., Lee S. J., Suh S. H., Jun J. Y., So I. and Kim K. W. Capsaicin inhibits the voltage-operated calcium channels intracellularly in the antral circular myocytes of guinea-pig stomach. *Life Sci* 2001; 68: 2347-2360.
- 189- Smith T. K. and Robertson W. J. Synchronous movements of the longitudinal and circular muscle during peristalsis in the isolated guinea-pig distal colon. *J Physiol* 1998; 506: 563-577.
- 190- So I. and Kim K. W. Nonselective cation channels activated by the stimulation of muscarinic receptors in mammalian gastric smooth muscle. *J Smooth Muscle Res* 2003; 36: 231-247.
- 191- Sotirov E., Papisova M. and Santha E. Nitric oxide (NO) increases acetylcholine release from and inhibits smooth muscle contraction of guinea-pig gastric fundus. *Brain Res Bull* 1999; 49: 297-302.
- 192- Spencer N. J., Smith C. B. and Smith T. K. Role of muscle tone in peristalsis in guinea-pig small intestine. *J Physiol* 2001a; 530: 295-306.
- 193- Spencer N. J. and Smith T. K. Simultaneous intracellular recordings from longitudinal and circular muscle during the peristaltic reflex in guinea-pig distal colon. *J Physiol* 2001b; 533: 787-799.
- 194- Spencer N. J., Walsh M. and Smith T. K. Purinergic and cholinergic neuroneuronal transmission underlying reflexes activated by mucosal stimulation in the isolated guinea pig ileum. *J Physiol* 2000; 522: 321-331.

- 195- Steinmetz M., Biere S., Hollah P., Rahn K. H. and Schlatter E. Heterogenous vascular effects of AP5A in different rat resistance arteries are due to heterogenous distribution of P2X and P2Y1 purinoceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 394: 1182-1187.
- 196- Taffe B. G., Takahashi N., Kensler T. W. and Mason R. P. Generation of free radicals from organic hydroperoxide tumor promoters in isolated mouse keratinocytes. Formation of alkyl and alkoxy radicals from tert-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide. *J Biol Chem* 1987; 262: 12143-12149.
- 197- Takeuchi T., Kishi M., Hirayama N., Yamaji M., Ishii T., Nishio H., Hata F. and Takewaki T. Tyrosine kinase involvement in apamin-sensitive inhibitory responses of rat distal colon. *J Physiol* 1999; 514: 177-188.
- 198- Takeuchi T., Nakajima H., Hata F. and Azuma Y. T. A minor role for Ca²⁺ sensitization in sustained contraction through activation of muscarinic receptor in circular muscle of rat distal colon. *Pflugers Arch* 2007; 454: 565-574.
- 199- Takeuchi T., Sumiyoshi M., Kitayama M., Hirayama N., Fujita A. and Hata F. Origin of Ca²⁺ necessary for carbachol-induced contraction in longitudinal muscle of the proximal colon of rats. *Jpn J Pharmacol* 2001; 87: 309-317.
- 200- Taylor L., Menconi M. J. and Polgar P. The Participation of hydroperoxides and oxygen radicalism the control of prostaglandin synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1983; 258: 6855-6857.
- 201- Teng B., Murthy K. S., Kuemmerle J. F., Grider J. R., Sase K., Michel T. and Makhlof G. M. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998; 275: G342-G351.
- 202- Tofukuji M., Metais C., Wang S. Y., Alper S. H. and Sellke M. D. Clotrimazole Is a Potent Vasodilator of the Rat Coronary Microcirculation. *J Surg Res* 1998; 77: 6-10.
- 203- Torihashi S., Fujimoto T., Trost C. and Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem* 2002; 277: 19191-19197.
- 204- Uc A., Murray J. A., Kooy N. and Conklin J. L. Effect of peroxynitrite on motor function of the opossum esophagus. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 30-37.
- 205- Uchiyama T. and Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* 2004; 40: 237-247.
- 206- Ueno T., Duenes J. A., Kost L. J. and Sarr M. G. Contractile activity of mouse small intestinal longitudinal smooth muscle. *J Surg Res* 2004a; 118: 136-143.
- 207- Ueno T., Duenes J. A., Zarroug A. E. and Sarr M. G. Nitroergic mechanisms mediating inhibitory control of longitudinal smooth muscle contraction in mouse small intestine. *J Gastrointest Surg* 2004b; 8: 831-841.
- 208- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M. and Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- 209- Wang G. D., Wang X. Y., Hu H. Z., Liu S., Gao N., Fang X., Xia Y. and Wood J. D. Inhibitory neuromuscular transmission mediated by the P2Y1 purinergic receptor in guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1483-G1489.
- 210- Wang X. Y., Paterson C. and Huizinga J. D. Cholinergic and nitroergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 531-543.
- 211- Watanabe C., Yamamoto H., Hirano K., Kobayashi S. and Kanaide H. Mechanisms of caffeine-induced contraction and relaxation of rat aortic smooth muscle. *J Physiol* 1992; 456: 193-213.
- 212- Wehner R., Gehring W. *Biologie et physiologie animale. Bases moléculaires, cellulaires, anatomiques et fonctionnelles.* De boeck Université (Paris) 1999, pp 435-461.

- 213- Wijetunge J., Lymn J. S. and Hughes A. D. Effect of inhibition of tyrosine phosphatases on voltage-operated calcium channel currents in rabbit isolated ear artery cells. *Brit J Pharmacol* 1998; 124: 307-316.
- 214- Wood Z. A., Schroder E., Harris J. R. and Poole L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40.
- 215- Wray S., Burdyga T. and Noble K. Calcium signalling in smooth muscle. *Cell Calcium* 2005; 38: 397-407.
- 216- Xue L., Farrugia G., Miller S. M., Ferris C. D., Snyder S. H. and Szurszewski J. H. Carbon monoxide and nitric oxide as coneurotransmitters in the enteric nervous system: Evidence from genomic deletion of biosynthetic enzymes. *Proc Nat Acad Soc U S A* 2000; 97: 1851-1855.
- 217- Yi C. R., Wei Z. K., Deng X. L., Sun Z. Y., Li X. R. and Tian C. G. Effects of coffee and caffeine on bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27: 1037-1043.
- 218- Yousufzai S. Y. K., Gao G. and Abdel-Latif A. A. Mitogen-activated protein kinase inhibitors suppress prostaglandin F₂ -induced myosin-light chain phosphorylation and contraction in iris sphincter smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2000; 407: 17-26.
- 219- Zizzo M. G., Mulè F. and Serio R. Activation of P2Y receptors by ATP and by its analogue, ADPbetaS, triggers two calcium signal pathways in the longitudinal muscle of mouse distal colon. *Eur J Pharmacol* 2008; 595: 84-89.

Résumé

Les différentes concentrations (0, 49 et 98 μM) de peroxy ABAP (ABAPOO^-) issus de la décomposition du 2,2'-Azobis (2-méthylpropionamide) dihydrochlorure (ABAP) induisent un arrêt des contractions spontanées pendant 2 à 4 min. L'augmentation de la concentration de l' ABAPOO^- à 196 μM prolonge la durée du silence à 7 min. Le tonus et la fréquence sont légèrement diminués alors que l'amplitude a tendance à augmenter. Le tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (0.03 - 1mM) diminue le tonus basal et l'amplitude des contractions de manière dépendante de la concentration mais la fréquence des contractions reste inchangée. L' ABAPOO^- (0, 49 et 98 μM) entraîne une légère diminution comprise entre 17% et 39% de la contraction phasique induite par le carbachol 1 μM . Par contre, le BHP n'a pas d'effet. L'addition de l' ABAPOO^- ne modifie pas les paramètres de la contraction sous EFS. Cependant, la durée du silence est diminuée. L'addition du KCl 80 mM ou le BaCl_2 5 mM induit une contraction biphasique, cette réponse n'est pas modifiée par l'addition de l' ABAPOO^- ou le BHP. Le BHP 1 mM n'a aucun effet sur la contraction phasique induite par le KCl ou le BaCl_2 . Par contre, la contraction tonique diminue respectivement de 44.1% et de 38.3% pour les tissus traités avec le KCl et le BaCl_2 . L' ABAPOO^- 98 et 196 μM augmente l'amplitude de la contraction phasique et la tension de la contraction tonique induites par le KCl ou le BaCl_2 . En présence du verapamil 1 μM , seul l' ABAPOO^- 196 μM est capable d'induire une reprise modérée des contractions spontanée et une réponse à l'addition du KCl ou du BaCl_2 . Le blocage des récepteurs muscariniques avec l'atropine 1 μM , les récepteurs nicotiniques ganglionnaires avec l'hexaméthonium 100 μM et la transmission nerveuse par la lidocaïne 100 μM diminue la durée du silence induit par l'addition de l'ABAP. Les bandelettes traitées avec l'isoprotérénol 100 μM ne répondent pas au peroxy ABAP et le tonus reste inchangé par rapport à celui noté en présence de l'isoprotérénol seul. Le blocage non spécifiques des canaux potassiques et les canaux potassiques voltage-dépendants par le tétraéthylammonium (TEA) 5 mM ou la 4-aminopyridine (4-AP) 4 diminue légèrement la relaxation induite par l'ABAP, alors que la durée du silence diminue par le prétraitement des bandelettes avec la 4-AP ou le clotrimazole. La déplétion des réserves calciques intracellulaire inhibe les contractions phasiques spontanées en présence ou en absence de l' ABAPOO^- . En présence du NDGA 30 μM , l'amplitude et la fréquence des contractions en présence de l'ABAP sont diminuées, alors que la quinacrine 10 μM diminue l'amplitude des contractions et inhibe la relaxation et le silence induits par l'ABAP. Alors que l'indométhacine 10 μM a des effets faibles. L'addition de l' ABAPOO^- abolit l'effet induit par l'orthovanadate avec une augmentation de la durée du silence.

Mots clés: contraction, iléon de lapin, muscle longitudinale, stress oxydant, ABAP, BHP.

المخلص

تؤدي جذور فوق الأوكسيد لجزيئة ABAP (ABAPOO^-) (0-196 ميكرومول/ل) إلى إيقاف التقلصات التلقائية للفانفي الأرنب بصفة عابرة في الزجاج. ينخفض توتر و تردد التقلصات قليلا أما السعة فتقبل إلى الإرتفاع. يقوم tert-butyl hydroperoxyde (t-BHP) (0.03-1 ملهول/ل) بخفض التوتر القاعدي و سعة التقلصات بطريقة متوقفة بالتركيز؛ إلا أن تردد التقلصات لم يتغير. لم يغير ABAPOO^- و t-BHP بشكل كبير النقل المرحلي المحفز بواسطة 1) carbachol ميكرومول/ل) و KCl (80 ملهول/ل) و BaCl_2 (5 ميليومول/ل). يخفض t-BHP النقل التوتري المحفز بواسطة KCl و BaCl_2 بشكل كبير، إلا أنه يزداد بواسطة ABAPOO^- بتركيز 98 و 196 ميكرومول/ل. في وجود verapamil، يؤدي ABAPOO^- (196 ميكرومول/ل) إلى استئناف متوسط للتقلصات التلقائية و استجابة لإضافة KCl أو BaCl_2 . يؤدي تثبيط كل من المستقبلات المسكارينية بواسطة atropine و المستقبلات النيكوتينية العقدية بواسطة hexamethonium و النقل العصبي بواسطة lidocaïne إلى تقليص مدة السكون الذي يسببه ABAP. يؤدي التثبيط غير النوعي لقنوات البوتاسيوم بواسطة tetraethylammonium و قنوات البوتاسيوم المنظمة بالجهد بواسطة 4-aminopyridine إلى انخفاض طفيف في الاسترخاء المحدث بواسطة ABAP؛ إلا أن مدة السكون تنخفض بواسطة 4-aminopyridine أو clotrimazole. في وجود nordihydroguaiaretic acid (مثبط lipoxygenase)، تنخفض سعة و تردد التقلصات بواسطة ABAPOO^- ؛ بينما يقوم quinacrine (phospholipase A_2) بخفض سعة التقلصات و تثبيط الاسترخاء و السكون المحدثين بواسطة ABAPOO^- . لم يظهر indomethacin (مثبط cyclooxygenase) تأثيرات معتبرة. إن إضافة ABAPOO^- تلغي النقل المحدث بواسطة orthovanadate و تضاعف مدة السكون.

الكلمات المفاتيح: مركبات azo، النقل العضلي، الفانفي، الأرنب، العضلات الطولية، الكرب التأكسدي، فوق أكسيد الهيدروجين.