

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة فرحات عباس، سطيف
UNIVERSITE FERHAT ABBAS, SETIF
Faculté des Sciences
Département de Biologie

THESE

Présentée par:

Hassiba BENABDALLAH

En vue de l'obtention du diplôme de:

Doctorat en Sciences

Option: Physiologie animale

Effets de la flavone et de la quercétine sur l'activité
contractile du muscle lisse circulaire du côlon de lapin
in vitro

Soutenue le:	22/10/2009	Devant la commission d'examen composée de:
Président:	Smain AMIRA	Maître de conférence, Université Ferhat Abbas, Sétif
Rapporteur:	Kamel GHARZOULI	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Examinatrice:	Souad AMEDDAH	Maître de conférence, Université Mentouri, Constantine
Examineur:	Mesbah LAHOUEL	Maître de conférence, Université Abdelhak Benhamouda, Jijel

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة فرحات عباس، سطيف
UNIVERSITE FERHAT ABBAS, SETIF
Faculté des Sciences
Département de Biologie

THESE

Présentée par:

Hassiba BENABDALLAH

En vue de l'obtention du diplôme de:

Doctorat en Sciences

Option: Physiologie animale

Effets de la flavone et de la quercétine sur l'activité
contractile du muscle lisse circulaire du côlon de lapin
in vitro

Soutenue le:	22/10/2009	Devant la commission d'examen composée de:
Président:	Smain AMIRA	Maître de conférence, Université Ferhat Abbas, Sétif
Rapporteur:	Kamel GHARZOULI	Professeur, Université Ferhat Abbas, Sétif
Examinatrice:	Souad AMEDDAH	Maître de conférence, Université Mentouri, Constantine
Examineur:	Mesbah LAHOUEL	Maître de conférence, Université Abdelhak Benhamouda, Jijel

Remerciements

*Je remercie tout d'abord Allah qui m'a donné la santé
et le courage pour terminer cette thèse.*

*Je tiens à présenter ma profonde gratitude et mes sincères
remerciements au Professeur Kamel Gharzouli qui m'a fait
bénéficiaire 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.*

*L'Agence Nationale pour le Développement de la Recherche en Santé
est également remerciée pour les supports financiers des projets de
recherche.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à la mémoire de mon grand-père

ESSAID BENABDALLAH

Qui a rendu l'âme le 11 novembre 2008

Il a été toujours derrière tous mes succès

À mes parents

À mes frères

À mes sœurs

À toute ma grande famille

À tous mes amis

Publication

Hassiba Benabdallah, Dalila Messaoudi, Kamel Gharzouli. The spontaneous mechanical activity of the circular smooth muscle of the rabbit colon *in vitro*. *Pharmacological Research* 57 (2008) 132–141.

Résumé

Le muscle lisse circulaire du côlon proximal, moyen et distal de lapin génère *in vitro* deux types de contractions spontanées: contractions phasiques (35% des bandelettes testées) de faible amplitude et de fréquence élevée et contractions géantes (65% des bandelettes) d'amplitude élevée et de fréquence faible. Les contractions géantes du muscle lisse du côlon moyen sont (1) insensibles à l'atropine 1 μM et à l'hexaméthonium 100 μM , (2) transitoirement abolies par le diméthylphénylpipérazine 5 μM , (3) prolongées par la L-arginine 4 mM, (4) converties en contractions phasiques (augmentation du tonus) par le déqualinium 10 μM , le tétraéthylammonium 5 mM (62% des bandelettes), le bleu de méthylène 10 μM , l'orthovanadate 30 μM ou la néostigmine 1 μM , (5) totalement bloquées par le diazoxide 100 μM et (6) réduites par le nitroprussiate de sodium de manière concentration-dépendante. Ces données suggèrent que les contractions géantes ont une origine myogène et sont contrôlées par la libération de l'oxyde nitrique qui active la guanyl cyclase qui stimule à son tour l'ouverture des canaux K^+ par l'intermédiaire de GMPc. La quercétine et la flavone à différentes concentrations réduisent les contractions géantes et la contraction tonique induite par le carbachol 10^{-5} M et le KCl 80 mM. La contraction induite par le déqualinium et le tétraéthylammonium est réduite par la flavone et la quercétine 30 μM . La flavone 30 μM ne modifie pas l'inhibition de l'activité spontanée induite par le nitroprussiate de sodium. A 100 μM , elle diminue la contraction induite par le bleu de méthylène 100 μM , l'orthovanadate 1 mM et la néostigmine 10 μM . Le prétraitement du tissu avec la flavone 30 μM diminue le tonus induit par le déqualinium, le tétraéthylammonium et le bleu de méthylène. Une faible stimulation de l'activité spontanée est induite par seulement la flavone 30 μM après application du diazoxide. Ces résultats suggèrent que la quercétine et la flavone inhibent les contractions géantes par (1) inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, (2) activation de la guanyl cyclase, (3) ouverture des canaux K^+ et (4) inhibition des tyrosines kinases.

Mots clés: canaux potassiques - côlon - contractions géantes - flavone - muscle lisse circulaire - quercétine - transmission nitrergique

Summary

The circular smooth muscle of the proximal, middle and distal colon of the rabbit generate two types of spontaneous contractions *in vitro*: phasic contractions (35% of the tested strips) of low amplitude and high frequency and giant contractions (65% of strips) of high amplitude and low frequency. The giant contractions observed in the middle colon are (1) insensitive to 1 μM atropine and 100 μM hexamethonium, (2) transitorily abolished by 5 μM dimethylphenyl piperazinium, (3) prolonged by 4 mM L-arginine, (4) converted into phasic contractions (increase of tone) by 10 μM dequalinium, 5 mM tetraethylammonium (62% of the strips), 10 μM methylene blue, 30 μM orthovanadate or 1 μM neostigmine, (5) completely blocked by 100 μM diazoxide, (6) reduced by sodium nitroprussiate in a concentration-dependent manner. These data suggest that the giant contractions are of myogenic origin and controlled by activation of guanyl cyclase through the release of nitric oxide, the opening of K^+ channels is then activated by cGMP. Quercetin and flavone, at various concentrations, reduce the giant contractions and the tonic contraction induced by 10 μM carbachol and 80 mM KCl. The contractions induced by dequalinium and tetraethylammonium are reduced by flavone and quercetin (30 μM). Flavone does not modify the inhibition of the spontaneous activity induced by sodium nitroprussiate. At 100 μM , flavone decreases the contraction induced by 100 μM methylene blue, 1 mM orthovanadate and 10 μM neostigmine. Pretreatment of the tissue with 30 μM flavone decreases the tone induced by dequalinium, tetraethylammonium and methylene blue. A weak stimulation of the spontaneous activity is induced by 30 μM flavone after application of diazoxide. These results suggest that quercetin and flavone inhibit the giant contractions by (1) inhibition of voltage-dependent Ca^{2+} channels, (2) activation of guanyl cyclase, (3) opening of K^+ channels and (4) inhibition of tyrosines kinases.

Key words: circular smooth muscle - colon, flavone - giant contractions - nitreergic transmission - potassium channels - quercetin

الملخص

تبدي أشرطة العضلة الملساء الدائرية للقولون القريب والمتوسط والبعيد للأرنب نوعين من التقلصات التلقائية: تقلصات مرحلية (contractions phasiques) (35% من الأشرطة المختبرة) بسعة ضعيفة و تردد مرتفع و تقلصات عملاقة (65% من الأشرطة) ذات سعة مرتفعة و تردد ضعيف. التقلصات العملاقة للعضلة الملساء للقولون المتوسط (1) غير حساسة للأتروبين 1 ميكرومول/ل و 100 hexaméthonium ميكرومول/ل و (2) ملغاة بصفة مؤقتة بواسطة diméthyl phénylpipérazine 5 ميكرومول/ل و (3) ممددة بالأرجنين 4 ميليومول/ل و (4) محولة إلى تقلصات مرحلية (إرتفاع التوتر) بواسطة 10 déqualinium ميكرومول/ل و 5 tétraéthylammonium ميليومول/ل (62% من الأشرطة) وأزرق الميثيلان 10 ميكرومول/ل و 30 orthovanadate ميكرومول/ل و néostigmine 1 ميكرومول/ل و (5) مثبطة كلياً بواسطة 100 diazoxide ميكرومول/ل و (6) مخفضة بواسطة nitroprussiate بطريقة متعلقة بالتركيز. تشير هذه النتائج إلى المنشأ العضلي للتقلصات العملاقة و مراقبتها بتحرير أكسيد النتريك الذي ينشط الغوانيل المحلقة والتي بدورها تنشط فتح قنوات البوتاسيوم عن طريق الغوانيل أحادي الفوسفات الحلقي. تخفض الكارستين و الفلافون بتركيز مختلفة التقلصات العملاقة و التقلص التوتري (contraction tonique) المحفز بواسطة الكرباكوول 10^{-5} مول/ل و KCl 80 ميليومول/ل كما تخفضان (30 ميكرومول/ل) التقلص المحفز بإستعمال déqualinium و tétraéthylammonium. لا تغير الفلافون 30 ميكرومول/ل تثبيط النشاط التلقائي المحفز بواسطة nitroprussiate. بينما الفلافون بتركيز أعلى (100 ميكرومول/ل) تخفض التقلص المحفز بأزرق الميثيلان 100 ميكرومول/ل و orthovanadate 1 ميليومول/ل و néostigmine 10 ميكرومول/ل. تؤدي المعاملة المسبقة للنسيج بالفلافون 30 ميكرومول/ل إلى التثبيط الجزئي للتقلص التوتري المحفز بواسطة déqualinium و tétraéthylammonium وأزرق الميثيلان. تحدث الفلافون 30 ميكرومول/ل فقط تحفيز ضعيف للنشاط التلقائي بعد تطبيق diazoxide. تشير هذه النتائج إلى أن الكارستين و الفلافون قادران على تثبيط التقلصات العملاقة بعدة أليات: (1) تثبيط قنوات الكالسيوم المرتبطة بالكمون و (2) تنشيط الغوانيل المحلقة و (3) فتح قنوات البوتاسيوم و (4) تثبيط التيروسين كيناز.

الكلمات المفاتيح: الإشارة بواسطة أكسيد النتريك- التقلصات العملاقة- العضلة الملساء الدائرية- الفلافون- القولون- الكارستين- قنوات البوتاسيوم

Liste des abréviations

4-AP: 4-aminopyridine	MLCK: Kinase de la chaîne légère de la myosine
5-HT: 5-hydroxytryptamine, sérotonine	MLCP: Phosphatase de la chaîne légère de la myosine
ACh: Acétylcholine	MYPT1: Sous-unité régulatrice de la MLCP
BK : Canal de large conductance	NANC : Non adrénérique non cholinergique
CG: Contraction géante	Neurone AH: Neurone afterhyperpolarisation
CGM: Contraction géante migrante	Neurone S: Neurone synaptique
CMM: Complexe moteur migrant	NK-A: Neurokinine A
CO: Monoxyde de carbone	NK-B: Neurokinine B
cpm: Contraction par minute	NO: Oxyde nitrique
CTX: Charybdotoxine	NOS: Oxyde nitrique synthase
DAG: Diacylglycérol	ODQ: 1 <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazolo[4,3- <i>a</i>]quinoxalin-1-one
DHP: Dihydropyridine	PACAP: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
DMPP: Diméthyl phénylpipérazine	PIP₂: Phosphatidyl inositol 4,5 biphosphate
ICC: Cellule interstitielle de Cajal	PP1c: Sous unité catalytique de la protéine phosphatase type 1
IK : Canal de conductance intermédiaire	ROK: Rho kinase
IP₃: Inositol 1,4,5 triphosphate	SK : Canal de faible conductance
K_{Ca} : Canal K ⁺ calcium-dépendant	SNP: Nitroprussiate de sodium
K_v : Canal K ⁺ voltage-dépendant	TEA: Tétréthylammonium
L-NAME: N ^ω -nitro-L-arginine méthyl ester	TK: Tachykinine
L-NNA: N ^G -nitro-L-arginine	TTX: Tétrodotoxine
MLC₂₀: Chaîne légère de myosine de 20 KDa	VIP: Peptide intestinal vasoactif

Etude bibliographique

Introduction	1
I. Physiologie de la contraction du côlon	
1. Anatomie générale du côlon	2
2. Le muscle lisse du côlon	4
2.1. La muqueuse et la sous-muqueuse	4
2.2. La musculuse	5
2.3. La séreuse	5
3. Le système nerveux entérique	5
3.1. Les plexus	5
3.2. Les neurones entériques	7
3.2.1. Classification morphologique	7
3.2.2. Classification électrophysiologique	8
3.2.3. Classification neurochimique	8
3.2.3.1. Les neurotransmetteurs excitateurs	8
3.2.3.2. Les neurotransmetteurs inhibiteurs	8
3.2.4. Classification fonctionnelle	10
3.2.4.1. Les neurones sensoriels	10
3.2.4.2. Les interneurones	11
3.2.4.3. Les motoneurones	11
4. Les cellules interstitielles de Cajal	12
5. La motilité du côlon	13
5.1. Le tonus du côlon	14
5.2. Les contractions phasiques	14
5.3. Les contractions géantes	14
5.4. Les contractions toniques	16
5.5. Le péristaltisme et la propulsion	16
5.6. Les propriétés électriques de la musculuse	17
6. Le contrôle de la contraction	19
6.1. Le contrôle extrinsèque de la contraction	19
6.1.1. L'innervation parasympathique	21
6.1.2. L'innervation sympathique	21
6.2. Le contrôle intrinsèque de la contraction	22
7. Les cellules musculaires lisses	27
7.1. L'activité électrique et les canaux ioniques	27
7.1.1. Les voies d'entrée du Ca^{2+} extracellulaire	27
7.1.1.1. Les canaux calciques voltage-dépendants	27

7.1.1.2. Les canaux cationiques non sélectifs.....	28
7.1.1.3. Les canaux calciques activés par la libération du Ca^{2+}	28
7.1.1.4. Les canaux cationiques non sélectifs sensibles à l'étirement	28
7.1.2. Les voies de la libération du Ca^{2+} intracellulaire	29
7.1.2.1. Les récepteurs de la ryanodine	29
7.1.2.2. Les récepteurs de l' IP_3	29
7.1.3. Les canaux K^+	29
7.1.3.1. Les canaux à six segments transmembranaires et un pore	30
7.1.3.2. Les canaux à deux segments transmembranaires et un pore	33
7.1.4. Les bloqueurs et les ouvreurs des canaux K^+	33
7.2. Le couplage excitation-contraction	34

II. Activité myorelaxante des flavonoïdes

1. Structure chimique et classification des flavonoïdes.....	37
2. Activités biologiques des flavonoïdes	39
3. Activité myorelaxante des flavonoïdes	39
3.1. Effets des flavonoïdes sur les enzymes impliquées dans les voies de la signalisation intracellulaire..	40
3.2. Effets des flavonoïdes sur la mobilisation du Ca^{2+}	41
3.3. Effets des flavonoïdes sur la voie nitreurgique	42
3.4. Effets des flavonoïdes sur les canaux K^+	43

Etude Expérimentale

I. Matériel et Méthodes

1. Les animaux d'expérience.....	45
2. Le dispositif de mesure de la contraction musculaire.....	45
3. Protocoles expérimentaux	46
3.1. Effets des agonistes et des antagonistes cholinergiques sur l'activité mécanique	46
3.2. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée	48
3.3. Rôle de la voie nitreurgique sur la contraction spontanée.....	48
3.4. Effets de l'orthovanadate sur l'activité mécanique	48
3.5. Effets de la quercétine et de la flavone sur l'activité mécanique spontanée	49
3.6. Effets de la quercétine et de la flavone sur la contraction induite par le carbachol et le KCl.....	49
3.7. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+	49
3.8. Effets de la flavone sur l'activité mécanique spontanée en présence du L-NAME et du SNP	50
3.9. Effets de la flavone avant et après stimulation de l'activité mécanique spontanée par diverses substances.....	50
4. Evaluation de la contraction du muscle lisse circulaire du côlon.....	50
5. Produits chimiques et solutions	52

6- Analyses statistiques	53
--------------------------------	----

II. Résultats expérimentaux

1. L'activité contractile spontanée.....	54
2. Effets des agonistes et des antagonistes cholinergiques sur l'activité mécanique du côlon.....	56
3. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée	63
3.1. Effet du TEA.....	63
3.2. Effet du déqualinium.....	63
3.3. Effet du diazoxide	66
4. Rôle de la voie nitreurgique	66
4.1. Effet du L-NAME, de la L-arginine et du SNP.....	66
4.2. Effet du bleu de méthylène	66
5. Effets de l'orthovanadate sur l'activité mécanique	71
6. Effets de la flavone et de la quercétine sur les contractions géantes	71
7. Effets de la flavone et de la quercétine sur la contraction induite par le carbachol et le KCl	76
7.1. La contraction induite par le carbachol	76
7.2. La contraction induite par le KCl.....	79
8. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+	79
8.1. Blocage des canaux K^+ par le TEA	79
8.2. Blocage des canaux K^+ par le déqualinium.....	81
8.3. Ouverture des canaux K^+ par le diazoxide	86
9. Effets de la flavone en présence du L-NAME et du SNP	86
10. Interférence de la flavone avec la néostigmine, le bleu de méthylène et le vanadate	90
10.1. Effets en présence de la néostigmine	90
10.2. Effets en présence du bleu de méthylène	90
10.3. Effets en présence de l'orthovanadate.....	90

III. Discussion

1. La contraction musculaire spontanée	95
2. Rôle de la voie nitreurgique dans la contraction spontanée	97
3. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée	99
4. Rôle de la phosphorylation des protéines intracellulaires	100
5. Effets de la flavone et de la quercétine sur les contractions géantes	101
6. Effets de la flavone et de la quercétine sur la contraction stimulée.....	104
7. Interférence de la flavone avec la voie nitreurgique.....	106
8. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+	107
9. Interférence de la flavone avec le vanadate.....	108

IV. Conclusions et perspectives

IV. Conclusions et perspectives	109
Références bibliographiques.....	111

Etude Bibliographique

Introduction

L'appareil gastro-intestinal doit accomplir le processus complexe de décomposer les aliments pour une absorption efficace. Les contractions musculaires locales mélangent les aliments qui sont acheminés le long du tube digestif par les mouvements péristaltiques. Pendant l'activité péristaltique de l'intestin, il y a des contractions phasiques des couches musculaires longitudinale et circulaire. Les cellules du muscle lisse circulaire génèrent *in vivo* plusieurs types de contractions spontanées: un tonus, des contractions phasiques et des contractions géantes migrantes (CGMs). Les CGMs observées *in vivo* au niveau du côlon de plusieurs espèces participent dans le mélange et la propulsion; l'équivalent de ces contractions *in vitro* sont les contractions géantes (CGs) qui se distinguent des contractions phasiques par leur amplitude élevée et leur faible fréquence. L'activité contractile du côlon est sous le contrôle du système nerveux entérique et du système nerveux autonome. La libération des neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs a respectivement pour fonction l'activation ou l'inhibition des chaînes nerveuses locales dont celles qui commandent les contractions musculaires. Les différents récepteurs des neurotransmetteurs constituent donc des cibles pharmacologiques en vue de l'altération ou de la correction d'un dysfonctionnement des diverses fonctions du côlon (sécrétion, réabsorption, motricité). Dans le contrôle des contractions du muscle lisse, la fixation de l'un ou de l'autre neurotransmetteur sur son récepteur spécifique peut induire directement ou indirectement l'ouverture ou la fermeture d'un canal ionique spécifique dans les cellules cibles. L'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et sa libération à partir des réserves intracellulaires constituent l'étape essentielle pour le couplage excitation-contraction. En parallèle, les canaux K^+ règlent le tonus musculaire, le rythme des contractions et même la relaxation du muscle lisse.

L'absence d'études approfondies sur les CGs chez le lapin a permis l'orientation de la présente étude vers la caractérisation de l'activité spontanée et induite du muscle lisse circulaire du côlon de lapin. La nature complexe des CGs offre l'opportunité d'aborder une étude pharmacologique originale chez cet animal en testant (1) l'effet des modulateurs de la transmission cholinergique, (2) le rôle des canaux K^+ , (3) le rôle de la voie nitrergique ainsi que (4) le rôle de la phosphorylation des protéines.

De nombreuses études rapportent que les flavonoïdes sont des substances myorelaxantes. Réputés pour leur rôle myorelaxant, les flavonoïdes qui peuvent interférer avec les contractions du tube digestif. Dans ce cadre, le rôle du Ca^{2+} a pris une grande part des investigations bien que l'interdépendance entre les canaux K^+ et la voie nitrergique est aussi capable de réduire l'activité contractile du muscle lisse. De ce fait, la flavone et la quercétine ont été introduites dans cette étude comme des flavonoïdes capables de modifier les CGs et même l'activité induite par la stimulation des récepteurs muscariniques et la dépolarisation des cellules musculaires.

I. Physiologie de la contraction du côlon

La motilité du tube digestif assure trois fonctions principales: la propulsion des aliments ingérés, une fonction assurée par une organisation particulière appelée péristaltisme; le mélange du chyme digestif afin de permettre d'une part sa dispersion mécanique et d'autre part le contact avec les sécrétions digestives qui assurent sa transformation en éléments absorbables et une fonction de réservoir attribuée à certains organes tels que l'estomac et le côlon (Wood, 2003).

Les contractions du muscle circulaire diminuent le diamètre de la lumière intestinale et stimulent le mélange et la propulsion, tandis que les contractions du muscle longitudinal raccourcissent la longueur de l'intestin et ont un effet minimal sur le mélange et la propulsion (Sarna, 2006).

La motricité du côlon conditionne étroitement la régulation des trois fonctions physiologiques: la concentration des matières fécales par absorption d'eau et d'électrolytes, l'entreposage et l'évacuation maîtrisée des selles et la digestion et l'absorption des aliments non encore digérés (Neutra et Padykula, 1984). En effet, le côlon ascendant est spécialisé dans le traitement du chyme fourni par l'iléon terminal. Il a été suggéré que cette partie du côlon n'est pas le site primaire des grandes fonctions de stockage et de mélange de l'intestin. La voie motrice du côlon ascendant est composée de propulsions péristaltiques orthograde et rétrograde. Le côlon transverse est spécialisé dans le stockage et la déshydratation des fèces, alors que le côlon descendant constitue le conduit entre le côlon transverse et sigmoïde (Wood, 2003).

1. Anatomie générale du côlon

Le gros intestin humain mesure environ 1.5 m de longueur et 6.5 cm de diamètre. Il s'étend de l'iléon à l'anus et est rattaché à la paroi abdominale postérieure par son mésocôlon (Parent, 1994). Les régions anatomiques principales du gros intestin sont le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum (Fig. 1). Le côlon transverse est délimité par les courbures hépatique et splénique. Le côlon sigmoïde est défini par sa forme et le rectum constitue la région la plus distale (Wood, 2003).

Il y a une grande variabilité dans la morphologie générale du côlon entre espèces animales (Fig. 2). En général, les carnivores possèdent un côlon dont la couche musculaire longitudinale est uniformément épaisse sur toute la circonférence de sorte que le côlon est une structure tubulaire uniforme, et le cæcum est court. Par contre, les herbivores possèdent un côlon allongé et présentent des saccules sur toute ou une partie de sa longueur, le cæcum est volumineux. La formation des haustrations du côlon provient de l'organisation de la couche musculaire longitudinale en trois bandes épaisses, les tænia, avec un ballonnement de la paroi entre les tænia. La règle que le côlon

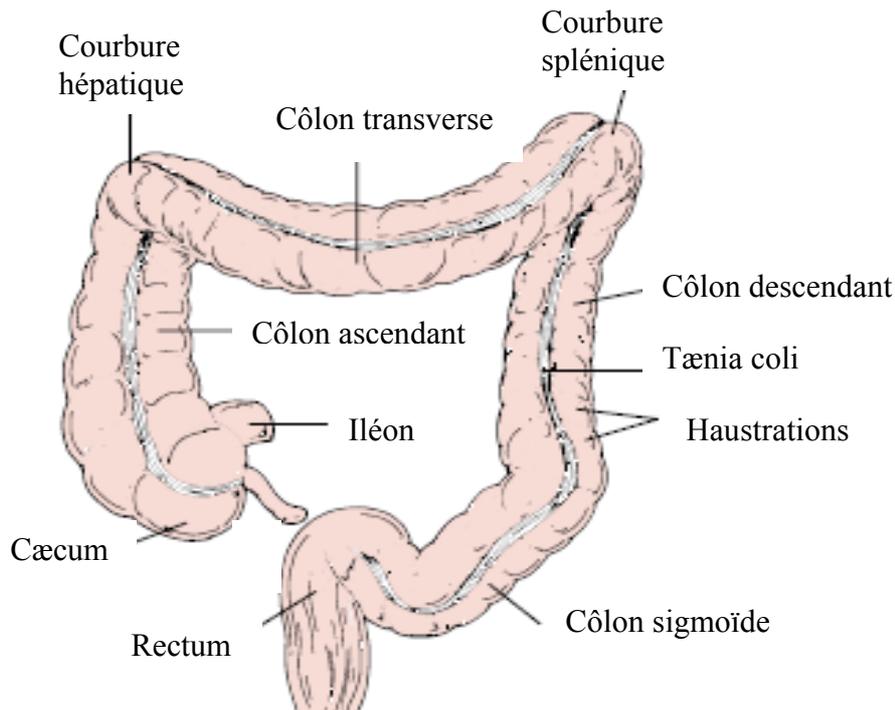


Figure 1. Anatomie du gros intestin (Wood, 2003).

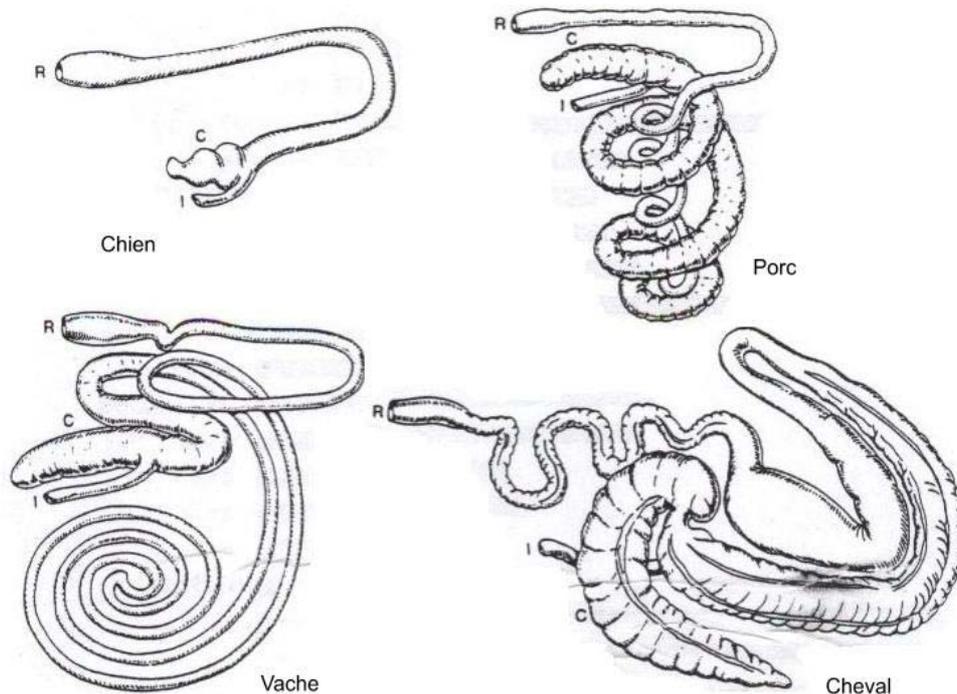


Figure 2. Morphologie générale du côlon de mammifères. I: iléon, C: cæcum, R: rectum. Chez la plupart des carnivores et de nombreux petits rongeurs, le côlon est un tube uniforme sans formations sacculaire, comme chez le chien. Dans les trois autres exemples, une élongation progressive de l'organe est observée, et des degrés variables de saccules apparaissent. Le segment présentant les saccules, chez les espèces où il est présent, est toujours présent à l'extrémité rostrale du côlon (Christensen, 1994).

tubulaire simple qui caractérise les espèces carnivores alors que le côlon avec les sacculs caractérise les espèces herbivores n'est pas une règle universellement vérifiée. Par exemple, le côlon des ruminants et périssodactyles diffèrent en ce que le côlon de ces derniers est beaucoup plus complexe (Fig. 2). Le rat et l'opossum, les deux des omnivores, ont un côlon simple, alors que le porc qui est aussi un omnivore a un côlon complexe. Les humains et d'autres primates ont un côlon d'herbivores (Christensen, 1994).

Selon Ehrlein et ses collaborateurs (1982), le côlon de lapin peut être divisé en côlon proximal qui possède des haustrations et un côlon distal plus étroit et sans haustrations. La partie orale du côlon proximal qui possède trois tænia et trois rangées d'haustrations est appelée côlon à trois haustrations; la partie suivante à une seule haustration et un seul tænia est appelée côlon à simple haustration. Du fait que la motilité du *fusus coli* (dépourvu d'haustrations) est similaire à celle du côlon à simple haustrations, cette partie du côlon est attribué au côlon proximal.

2. Le muscle lisse du côlon

La paroi du côlon comprend les quatre couches fondamentales présentes dans les autres organes creux du tube digestif (Daniel et al., 2001) (Fig. 3). Ces couches sont de l'intérieur vers l'extérieur la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse.



Figure 3. Coupe histologique du côlon (coloration: hématoxyline-éosine) (Gunin, 2000).

1- La muqueuse; 2 - La sous-muqueuse

3- La musculuse; 4 - La séreuse

5- Les follicules lymphoïdes dans la lamina propria de la muqueuse.

2.1. La muqueuse et la sous-muqueuse

La paroi du gros intestin diffère de celle de l'intestin grêle sous plusieurs aspects. Sa muqueuse ne présente ni villosités ni valvules conniventes permanentes, elle est composée schématiquement de deux tissus associés: la lamina propria ou chorion (tissu conjonctif) et des structures surtout épithéliales, les cryptes ou glandes. La lamina propria s'étend jusqu'à la sous-muqueuse et contient

plusieurs lymphocytes, macrophages et cellules plasmiques qui produisent localement les IgA. Les types cellulaires présents à la surface ainsi que les glandes ressemblent à ceux de l'intestin grêle, mais le nombre de cellules caliciformes sécrétrices de mucus y est beaucoup plus élevé (Neutra et Padykula, 1984; Parent, 1994).

La sous-muqueuse ressemble à celle du reste du tube digestif. Elle est formée de tissu conjonctif qui relie la muqueuse à la musculature. Elle est richement vascularisée et contient une partie du plexus nerveux sous-muqueux ou plexus de Meissner, fibres qui innervent la musculature muqueuse (Neutra et Padykula, 1984; Parent, 1994; Olsson et Holmgren, 2001).

Une autre couche fine appelée la musculature muqueuse, sépare la muqueuse de la sous-muqueuse. L'épaisseur de cette couche varie en fonction de l'espèce et de la région du tube digestif (Olsson et Holmgren, 2001).

2.2. La musculature

Le côlon possède à la fois une couche musculature lisse circulaire et une couche musculature lisse longitudinale. En général, sa paroi est constituée d'une couche externe de cellules constituant la couche de muscle lisse longitudinal. Perpendiculairement à cette couche, une autre couche adjacente et plus épaisse forme la couche de muscle lisse circulaire (Furness et Costa, 1987; Daniel et al., 2001) (Fig. 4). 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 musculature circulaire est divisée en une fine couche interne et une couche externe (Olsson et Holmgren, 2001).

2.3. La séreuse

Elle fait partie du péritoine viscéral (la plus grande membrane séreuse du corps) et constitue la couche externe du tube digestif. Elle est constituée de tissu conjonctif de soutien très résistant qui supporte le tube dans sa portion intestinale et lui donne une forme particulière. La séreuse contient des éléments vasculaires (branches des artères et veines mésentériques) (Neutra et Padykula, 1984; Parent, 1994).

3. Le système nerveux entérique

L'arrangement des neurones intramuraux du côlon en plexus laminaires ressemble à celui qui prévaut dans tout le reste du tube digestif (Fig. 4).

3.1. Les plexus

L'innervation intrinsèque du muscle intestinal est assurée par le système nerveux intrinsèque ou entérique. Sa densité considérable de neurones et d'interneurones, responsables d'une capacité

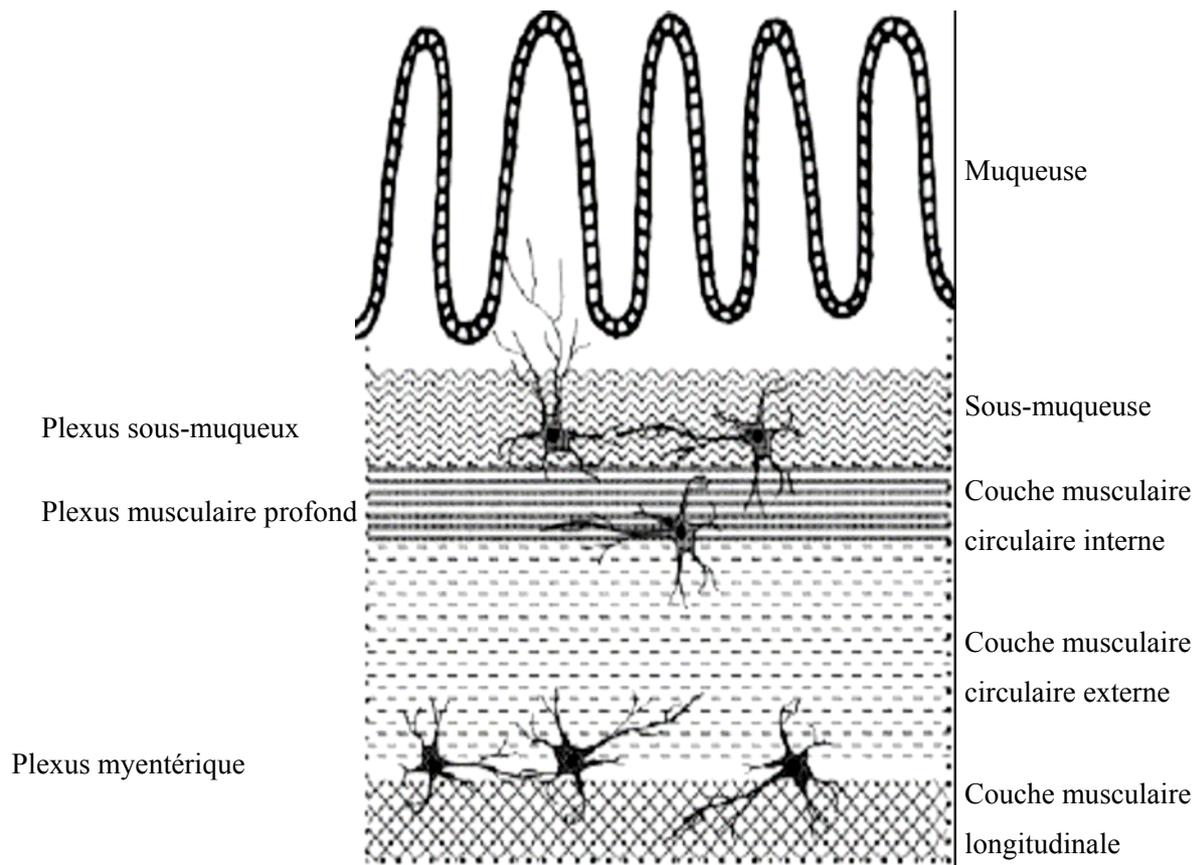


Figure 4. Représentation schématique de la paroi intestinale chez les vertébrés (Olsson et Holmgren, 2001).

propre d'intégration, lui a valu le qualificatif de «cerveau entérique» (Holzer et al., 2001; Boeckxstaens, 2002). Le système nerveux entérique se compose essentiellement des plexus intramuraux: le plexus myentérique (plexus d'Auerbach) situé entre les couches musculaires longitudinale et circulaire et le plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) entre le muscle circulaire et la musculaire muqueuse (Furness, 2000; Daniel et al., 2001; Holzer et al., 2001). Le plexus myentérique, le plus volumineux et le plexus sous-muqueux, moins développé, contiennent des cellules ganglionnaires et des réseaux denses d'axones. Le plexus myentérique est responsable du contrôle moteur tandis que le plexus sous-muqueux est impliqué dans les sécrétions gastro-intestinales et le contrôle du débit sanguin local (Furness et al., 2004). Les corps cellulaires des neurones des plexus myentérique et sous-muqueux envoient des projections nerveuses aux muscles, à la muqueuse et d'un plexus à l'autre (Daniel et al., 2001).

Le système nerveux entérique ne constitue pas uniquement un élément de commande post-ganglionnaire de la voie extrinsèque, mais assure au contraire une autonomie relative au côlon. Il peut lui-même initier et propager une activité motrice (Olsson et Holmgren, 2001; Boeckxstaens, 2002). Il est relié au système nerveux central par l'innervation extrinsèque comprenant les nerfs sympathiques et parasympathiques. Au moyen de ces raccords neuronaux, l'information est transmise aux ganglions pré- et para-vertébraux, à la moelle épinière, au bulbe cérébral et finalement au cerveau. Le couplage entre le système nerveux intrinsèque et les fibres lisses est assuré par les cellules interstitielles de Cajal (ICCs) (Boeckxstaens, 2002).

3.2. Les neurones entériques

Les neurones du système nerveux entérique peuvent être classés suivant leurs propriétés morphologiques, électrophysiologiques, neurochimiques et fonctionnelles (Hansen, 2003b).

3.2.1. Classification morphologique

La classification morphologique des neurones entériques a été dérivée du travail de l'histologiste russe A. S. Dogiel qui a divisé les neurones entériques en phénotypes morphologiques (Furness et Costa, 1987; Brehmer et al., 1999).

Selon leur morphologie, les neurones entériques sont classés en Dogiel type I jusqu'à Dogiel type VII, et neurones géants (Hansen, 2003b). La plupart des neurones sont de type I à III (Furness, 2000). Les neurones Dogiel type II avec des propriétés électrophysiologiques et chimiques semblables ont été trouvés dans le gros intestin du cobaye et dans l'intestin grêle du rat (Mann et al., 1998; Lomax et al., 1999; Neunlist et al., 1999). En plus de ce type de neurones, le côlon distal de souris exprime des neurones Dogiel type I (Neylon et al., 2004).

3.2.2. Classification électrophysiologique

La classification électrophysiologique des neurones entériques les divise également en neurones S (synaptiques) et neurones AH (after-hyperpolarisation) (Wood, 1994; Furness, 2000). Fonctionnellement, les motoneurones et les interneurones excitateurs et inhibiteurs semblent être des neurones S/Dogiel type I (Furness et al., 1998; Hansen, 2003b). Les neurones AH sont caractérisés par des hyperpolarisations ultérieures durables. Ils ont une morphologie Dogiel type II et ce sont des neurones sensoriels intrinsèques (Furness et al., 1998). Les enregistrements électrophysiologiques combinés avec l'injection intracellulaire d'un marqueur indiquent que tous les neurones Dogiel type II dans le plexus myentérique du côlon distal du cobaye et de la souris sont des neurones AH (Lomax et al., 1999; Neylon et al., 2004). Dans le plexus myentérique du côlon proximal du cobaye, les neurones sont classés en types AH et S (Messenger et al., 1994).

3.2.3. Classification neurochimique

Les neurones du système nerveux entérique expriment habituellement une combinaison de neurotransmetteurs différents, un phénomène connu sous le nom de codage chimique (Fig. 5) (Hansen, 2003b). Dans le système nerveux entérique, plus de 30 neurotransmetteurs ont été identifiés (Galligan, 1998; Furness et al., 2000); ils regroupent de petites molécules comme la noradrénaline et la sérotonine (5-HT), des macromolécules comme la substance P et autres peptides et même des gaz comme l'oxyde nitrique (NO) et le monoxyde de carbone (CO) (Hansen, 2003b).

3.2.3.1. Les neurotransmetteurs excitateurs

La transmission excitatrice dans le système nerveux entérique peut être placée dans deux catégories: la transmission rapide à travers les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (ACh), les récepteurs purinergiques P2X de l'ATP et les récepteurs sérotoninergiques 5-HT₃ et la transmission lente via les récepteurs muscariniques de l'ACh et les récepteurs NK₁ et NK₃ des tachykinines (TKs) (Galligan et al., 2000; Holzer et al., 2001). La communication excitatrice entre les motoneurones et le muscle lisse intestinale est réalisée par les récepteurs muscariniques de l'ACh et les récepteurs NK₁ et NK₂ des TKs (Maggi et al., 1994). L'ATP, via les récepteurs P2X et P2Y, joue aussi un rôle important dans la transmission neuro-neuronale excitatrice au niveau du muscle longitudinal et circulaire (Spencer et al., 2000; Furness et Sanger, 2002). La 5-HT synthétisée, stockée et libérée par les cellules entérochromaffines et les neurones entériques participe dans la transmission excitatrice à travers les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₄ localisés sur les neurones cholinergiques (Briejer et al., 1995; Holzer et al., 2001).

3.2.3.2. Les neurotransmetteurs inhibiteurs

La noradrénaline est un neurotransmetteur libéré à partir des nerfs sympathiques et stimule les récepteurs β -adrénergiques entraînant la relaxation du muscle (Longhurst et Uvelius, 2001). En plus

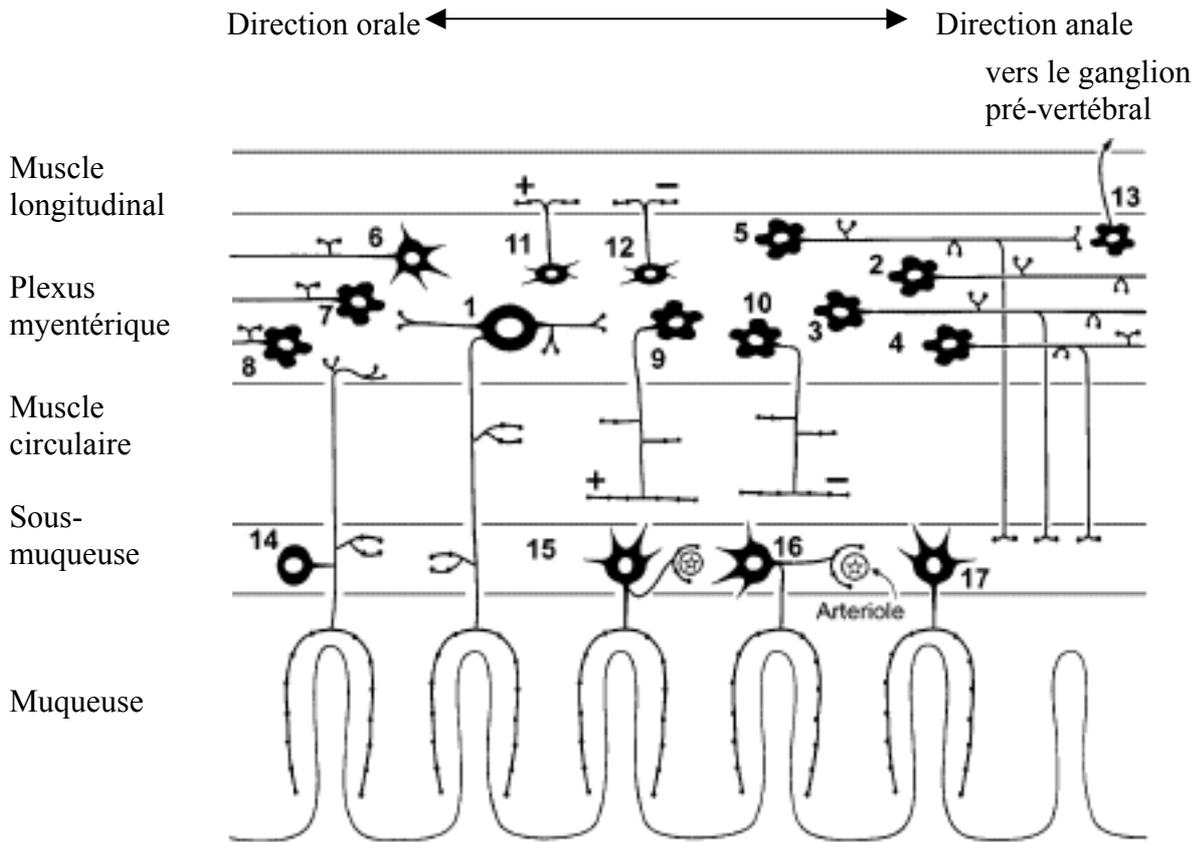


Figure 5. Diagramme du codage chimique des différents types de neurones dans le côlon distal de cobaye (Lomax et Furness, 2000).

Les neurones myentériques: 1: ACh/calbindine/TKs: neurones primaires intrinsèques afférents; 2: ACh/VIP; 3: NOS; 4: ACh/5-HT/CGRP/calbindine/ \pm calretinine; 5: ACh/VIP/GRP/ \pm NOS/ \pm calbindine; 6: ACh/SOM/calretinine/VIP; 7: ACh/TKs/enképhaline/ \pm VIP/ \pm calretinine; 8: ACh/neuropeptide Y/ \pm TKs/ \pm SOM/ \pm calretinine; 9: ACh/TKs/ \pm enképhaline; 10: NOS/VIP/ \pm GABA/ \pm neuropeptide Y; 11: ACh/TKs/calretinine; 12: NOS/ \pm VIP/ \pm enképhaline; 13: ACh/ \pm NOS/ \pm VIP/ \pm GRP/ \pm calbindine/ \pm calretinine: neurones intestinofuges.

Les neurones de la sous-muqueuse: 14: ACh/TKs/calbindine: neurones primaires intrinsèques afférents; 15: NOS/VIP/ \pm calbindine; 16: ACh/calretinine; 17: ACh/neuropeptide Y/CGRP/SOM.

5-HT: Serotonin; ACh: Acetylcholine; CGRP: Calcitonin gene-related peptide; GABA: Gamma aminobutyric acid; GRP: Gastrin-releasing peptide; NOS: NO synthase; SOM: Somatostatine; TKs: thachykinines; VIP: Vasoactive intestinal peptide.

de son rôle excitateur, l'ATP est aussi un neurotransmetteur inhibiteur non adrénérgique non cholinérgique (NANC) (Olsson et Holmgren, 2001). Le système nerveux entérique exprime d'autres neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le NO, le VIP (vasoactive intestinal peptide), le PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating peptide) et le CO.

Le NO est un neurotransmetteur NANC du système nerveux central, périphérique et entérique (Goyal et Hirano, 1996; Goyal et Xue, 1998). Dans le système nerveux entérique, le NO est produit dans les neurones entériques à partir de la L-arginine par l'oxyde nitrique synthase (nNOS) et agit comme un neurotransmetteur inhibiteur intercellulaire (Xue et al., 2000).

L'existence de l'hème oxygénase type 2, enzyme biosynthétique du CO, dans les neurones entériques et le changement de la fonction intestinale du jéjunum de souris suite à la suppression génomique de cette enzyme expliquent que le CO est un neurotransmetteur du système nerveux entérique (Xue et al., 2000). Il est produit avec le fer ferreux et la bilirubine par l'action de l'hème oxygénase (HO-2), en collaboration avec la cytochrome P450 réductase et la biliverdine réductase (Baradano et Snyder, 2001). Le CO est reconnu comme un neurotransmetteur inhibiteur NANC du muscle lisse de la vésicule biliaire du chien (Alcon et al., 2001b), de l'estomac et du jéjunum humain (Miller et al., 2001) et du jéjunum de porc (Matsuda et al., 2004). Le CO généré dans les ICCs est un facteur hyperpolarisant pour le muscle circulaire et comme le NO, il stimule la guanyl cyclase soluble pour produire le GMPc (Szurszewski et Farrugia, 2004).

Le VIP et son homologue, le PACAP, sont des neurotransmetteurs inhibiteurs libérés à partir des fibres NANC. Ils induisent la relaxation du muscle lisse par l'hyperpolarisation de la membrane (Plujà et al., 2000).

3.2.4. Classification fonctionnelle

Les neurones du système nerveux entérique sont classés selon leurs fonctions en neurones sensoriels, interneurones, motoneurones, neurones sécréto-moteurs et neurones vasomoteurs (Brookes, 2001; Hansen, 2003b).

3.2.4.1. Les neurones sensoriels

Plusieurs types de neurones sensoriels sont détectés dans l'intestin. Ces neurones regroupent un réseau dense de neurones extrinsèques (afférents vagues et spinaux avec leurs corps cellulaires en dehors de la paroi intestinale) et de neurones afférents intrinsèques (avec leurs corps cellulaires dans la paroi intestinale) (Furness et al., 1998; Hansen, 2003b). Ils forment et fonctionnent comme un réseau de surveillance avec les cellules endocrines et les cellules immunitaires (Hansen, 2003b). Les neurones afférents extrinsèques communiquent avec les neurones intrinsèques et, probablement, de manière réciproque (Holzer, 2002). Les neurones sensoriels incluent les mécano-, les chémo- et les thermorécepteurs. Les mécanorécepteurs sont activés par la distension et génèrent la contraction tonique du muscle. Les neurones sensoriels expriment une large gamme de récepteurs

membranaires (pour la substance P, le VIP, etc.) qui peuvent moduler leur sensibilité (Hansen, 2003b).

3.2.4.2. Les interneurones

Les interneurones sont également des neurones S et AH et habituellement des neurones Dogiel type II. La plupart des interneurones sont de type descendant. Les interneurones ascendants sont principalement cholinergiques; tandis que les interneurones descendants présentent un complexe de neuromédiateurs comprenant l'ACh, le NO, le VIP, la 5-HT et la somatostatine (SOM) (Furness, 2000). Des données indiquent que le côlon possède des interneurones descendants dont les codages chimiques sont ChAT/5-HT, NOS et ChAT/NOS/VIP (ChAT: ACh transférase) (Costa et al., 1996). Le plexus myentérique du côlon distal du cobaye exprime quatre types d'interneurones descendants [ACh/VIP, NOS, ACh/5-HT/CGRP (calcitonin gene-related peptide)/calbindine/±calretinine et ACh/VIP/GRP (gastrin-releasing peptide)/±NOS/±Calbindine] et trois types ascendants [ACh/SOM/calretinine/VIP, ACh/TKs/enképhalines ±VIP±calretinine, ACh/neuropeptide Y /±TK/±SOM/±calretinine] (Lomax et Furness, 2000).

3.2.4.3. Les motoneurones

Ce sont des neurones S/Dogiel type I (Hansen, 2003b). Il y a trois types de motoneurones: les motoneurones du muscle, les sécréto-motoneurones et les neurones qui innervent les cellules entéro-endocrines (Furness, 2000; Hansen, 2003b).

Les motoneurones du muscle innervent les muscles longitudinal et circulaire et la musculaire muqueuse dans tout le tube digestif. Ils sont excitateurs ou inhibiteurs et libèrent les neurotransmetteurs de la contraction ou de la relaxation. Pour les neurones excitateurs, la transmission est principalement muscarinique M₂ et M₃ (Furness, 2000; Furness et Sanger, 2002; Hansen, 2003b) du fait que les antagonistes muscariniques inhibent la motilité gastro-intestinale *in vivo* (Borody et al., 1985; Galligan et al., 1986). Cependant, il existe une excitation résiduelle résistante au blocage muscarinique, principalement due à la libération des TKs (substance P et neurokinine A: NK-A) (Lippi et al., 1998). Les antagonistes des récepteurs tachykinergiques ont peu d'effets sur la motilité gastro-intestinale, ce qui explique que l'ACh est le neurotransmetteur excitateur principal des motoneurones du muscle. Pour les neurones inhibiteurs, qui expliquent une grande partie des réflexes inhibiteurs descendants et des réflexes d'accommodation dans l'intestin, les neurotransmetteurs sont le NO, le VIP, l'ATP, le PACAP, le GABA (acide γ-aminobutyrique), le CO et le neuropeptide Y (Mashimo et al., 1996; Xue et al., 2000; Furness et Sanger, 2002). Ces neurotransmetteurs agissent directement sur le muscle ou indirectement par l'intermédiaire des ICCs (Huizinga et al., 2000; Ward et Sanders, 2001). Les motoneurones excitateurs des couches musculaires circulaire et longitudinale du côlon distal du cobaye sont respectivement des neurones à ACh/TKs/enképhalines et à ACh/TKs/calrétinine; alors que les motoneurones à

NOS/VIP/ \pm GABA/ \pm neuropeptide Y et NOS/ \pm VIP/ \pm enképhalines constituent respectivement les motoneurones inhibiteurs des couches circulaire et longitudinale (Lomax et Furness, 2000).

4. Les cellules interstitielles de Cajal

La régulation de l'activité motrice colique est complexe et repose sur l'existence de ICCs. Ces cellules spécialisées sont responsables de la génération des ondes lentes dans l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin (Wood, 2003).

Santiago Ramon y Cajal (1892) a été le premier à rapporter l'existence des ICCs dans le tube digestif. Les ICCs sont les cellules pacemakers (Thuneberg, 1982) d'un diamètre d'environ 20 μ m (Hanani et al., 1998). Elles sont différentes des fibres lisses par leur pauvreté en éléments contractiles, la présence du récepteur tyrosine kinase c-Kit est utilisée comme moyen d'identification immuno-histochimique de ces cellules (Maeda et al., 1992; Ward et al., 1994). Les ICCs développent de nombreuses ramifications interconnectées pour former un réseau et communiquent entre elles et avec les cellules musculaires lisses par des jonctions de type gap (Daniel, 2004). Les jonctions communicantes connectent électriquement les ICCs et le muscle circulaire (Daniel et Wang, 1999).

Dans le côlon de plusieurs espèces (chien, cobaye, rat, souris), les ICCs constituent les cellules pacemaker associées au plexus myentérique et au plexus sous-muqueux (Smith et al., 1987; Lomax et Furness, 2000; Plujà et al., 2001; Okishio et al., 2005). De plus, le côlon a un réseau d'ICCs entremêlé aux fibres musculaires lisses (Sanders et al., 2006). Chez le rat, la densité des ICCs dans le côlon proximal, moyen et distal est la même: de 90 à 120 cellules/mm² dans le plexus d'Auerbach et de 50 à 60 cellules/mm² dans le plexus sous-musculaire (Alberti et al., 2005). Les études immuno-histochimiques effectuées sur le côlon distal de souris montrent qu'un grand nombre d'ICCs est présent dans le plexus myentérique (ICC-MY), dans la couche intramusculaire du muscle circulaire (ICC-IMC) et dans le plexus sous-muqueux et un petit nombre se trouve dans les couches intramusculaires du muscle longitudinal (ICC-IML). Par contre, les ICCs sont absentes dans le plexus musculaire profond (Okishio et al., 2005).

Les ICCs sont douées de nombreux rôles physiologiques, les plus importants sont: 1) le siège de l'automatisme du tube digestif (pacemaker), 2) la dépolarisation des cellules musculaires lisses en ouvrant leurs canaux calciques voltage-dépendants. Cela est à l'origine des ondes lentes, qui déterminent un rythme électrique de base dont la fréquence est propre aux différents segments du tube digestif, 3) la conduction électrique des ondes lentes et 4) la transmission des signaux entre les neurones et les muscles du système gastro-intestinal et par conséquent, elles expriment des récepteurs pour différents neurotransmetteurs (Vannucchi, 1999; Hanani et Freund, 2000). Le NO, neurotransmetteur inhibiteur du côlon, augmente la concentration du Ca²⁺ intracellulaire dans les ICCs mais la réduit dans les cellules musculaires (Publicover et al., 1993). Il apparaît que cette

augmentation de la concentration du Ca^{2+} dans les ICCs induit la synthèse du NO dans ces cellules. Le NO diffuse par la suite dans les cellules musculaires et réduit la concentration du Ca^{2+} et provoque la relaxation du muscle (Hanani et Freund, 2000).

La neurotransmission des neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs vers la musculature du tube digestif est considérée se faire principalement via les ICCs (Ward et Sanders, 2001; Huizinga et al., 2004). Les neurones moteurs excitateurs et inhibiteurs sont étroitement associés aux ICCs dans le plexus musculaire profond (ICC-DMP) du petit intestin et aux ICCs intramusculaires (ICC-IM) du tractus gastro-intestinal proximal et distal. Ils forment des structures comme les synapses avec l'ICC-IM et l'ICC-DMP (Ward et Sanders, 2001). Les ICCs agissent comme des pacemakers de l'activité motrice dans le tube digestif, transmettent les signaux nerveux aux cellules musculaires, et ce sont des détecteurs de l'activité mécanique (Thuneberg, 1982; Huizinga et al., 2004). Les ICCs pacemaker génèrent des oscillations spontanées cycliques du Ca^{2+} en synchronisation avec leur activité pacemaker. Les courants entrants rythmiques spontanés dans les ICCs qui sont à la base de l'activité pacemaker de l'intestin sont liés à cette oscillation du Ca^{2+} (Torihashi et al., 2002; Huizinga et al., 2004). La transmission des signaux entre les ICCs et les cellules musculaires est vraisemblablement réalisée par des jonctions communicantes (Daniel et al., 2001; Daniel, 2004).

5. La motilité du côlon

Les préparations du muscle lisse du tractus gastro-intestinal développent habituellement des contractions spontanées avec des fréquences et des amplitudes variées (Olsson et Holmgren, 2001). La nature de cette activité n'est pas entièrement comprise bien que la participation des ICCs et des neurones entériques a été impliquée. Plusieurs études ont démontré que les régions pacemakers, où les contractions sont initiées, correspondent aux surfaces contenant les ICCs et que l'inactivation chimique de ces cellules supprime l'activité rythmique. Par ailleurs, ni la tétrodotoxine (TTX), inhibiteur des canaux sodiques, ni l'atropine, antagoniste des récepteurs muscariniques n'ont des effets sur les contractions rythmiques du tractus gastro-intestinal de rat (Mungan et al., 1992). En parallèle, la TTX augmente les contractions mais n'a aucun effet sur l'activité électrique de l'intestin de chien (Cayabyab et al., 1997).

Chez plusieurs espèces, y compris le chien, l'être humain et le rat, les cellules du muscle lisse circulaire du côlon génèrent spontanément *in vivo* trois types de contraction: un tonus, des contractions phasiques rythmiques et des CGMs (Sarna, 1991). Cependant, les bandelettes du côlon humain et du chien génèrent *in vitro* seulement un tonus et des contractions phasiques. Par contre, celles du côlon du rat génèrent spontanément des CGs similaires aux CGMs (Gonzalez et Sarna, 2001b).

5.1. Le tonus du côlon

Le muscle lisse peut exister dans un état partiellement contracté pendant de longues périodes, un état est appelé tonus musculaire. Dans des conditions basales, les préparations du côlon proximal de lapin génèrent un tonus avec une fréquence et une amplitude irrégulières des contractions (Barocelli et al., 1995). Au niveau du côlon du rat, des concentrations élevées d'ACh augmentent le tonus musculaire sur lequel sont superposées des contractions phasiques (Gonzalez et Sarna, 2001b).

L'augmentation du tonus qui diminue le diamètre de la lumière a peu ou pas d'effet sur le mélange et la propulsion dans le côlon. Les voies de la signalisation cellulaire pour le couplage excitation-contraction qui génèrent le tonus sont différentes de celles qui génèrent les contractions phasiques rythmiques et les CGMs (Sarna, 2006). Le tonus règle la taille de la lumière, et il n'est pas réglé par les ondes lentes. La diminution de la taille de la lumière peut augmenter l'efficacité des contractions phasiques dans le mélange et la propulsion du contenu intestinal (Gonzalez et Sarna, 2001b).

5.2. Les contractions phasiques

Les contractions phasiques sont réglées par les ondes lentes. Leur fréquence maximale est la même que celle des ondes lentes (Gonzalez et Sarna, 2001b). Elles induisent les mouvements propulsifs et mélangent le repas ingéré avec les sécrétions exocrine, endocrine et muqueuse. Ces contractions sont absentes dans l'œsophage qui ne nécessite pas le mélange, la digestion et l'absorption des aliments. Elles sont caractérisées par une distance de propagation, une amplitude et une fréquence de contractions moyennes (Cowles et Sarna, 1990; Gonzalez et Sarna, 2001b; Sarna, 2006). L'amplitude des contractions phasiques du côlon proximal, moyen et distal du rat est plus petite que celle des CGMs, suggérant que son rôle dans le mélange et la propulsion chez le rat est minimal par rapport à celui des CGMs (Li et al., 2002). La fréquence des contractions phasiques enregistrées *in vivo* ou *in vitro* est la même dans les trois régions du côlon (Gonzalez et Sarna, 2001b; Li et al., 2002). En effet, Li et ses collaborateurs (2002) ont rapporté que les fréquences moyennes des contractions phasiques du côlon proximal, moyen et distal de rat sont respectivement 12.5 ± 0.5 , 10.5 ± 0.1 et 12.5 ± 0.7 contractions par minute. Cependant, l'activité phasique spontanée des préparations du côlon proximal de lapin est caractérisée par une amplitude et une fréquence irrégulières (Barocelli et al., 1995).

5.3. Les contractions géantes

Les CGMs sont des contractions ultrapropulsives de grande amplitude et de longue durée en comparaison avec les contractions phasiques (Gonzalez et Sarna, 2001b; Sarna, 2006). Les CGMs ne sont pas réglées par les ondes lentes car leur durée est beaucoup plus longue que celle d'un

simple cycle des ondes lentes (Sarna, 1987). Les mécanismes précis de la génération des CGMs ne sont pas compris. Cependant, des données montrent que ces contractions sont le résultat de la libération soutenue et importante de l'ACh au niveau des jonctions neuro-effectrices (Sarna, 2003). L'accumulation soutenue de l'ACh stimule le couplage excitation-contraction des cellules musculaires lisses circulaires. Par exemple, la néostigmine, inhibiteur de l'acétylcholine estérase, stimule les CGMs au niveau du côlon par accumulation de l'ACh au niveau des jonctions neuromusculaires (Sarna, 2006). A la différence du côlon du chien et humain, le côlon du rat montre des CGMs fréquentes. En effet, le côlon proximal, moyen et distal du rat génère des CGMs dont les fréquences sont respectivement 44.1 ± 6.0 , 34.5 ± 6.1 et 16.9 ± 3.0 contractions par heure (Li et al., 2002). *In vivo*, ces contractions sont stimulées par la libération neuronale de l'ACh qui agit via les récepteurs M_3 et leur fréquence sont partiellement supprimées par la libération constitutive du NO. L'administration intra-péritonéale de l'atropine ou de l'hexaméthonium inhibe significativement les CGMs spontanées le long du côlon. L'inhibition de la NOS par le N ω -nitro-L-arginine méthyl ester (L-NAME) 10 mg/kg augmente la fréquence des CGMs de 0.6 à 1.06 CGMs/minute dans le côlon proximal du rat, mais elle reste sans aucun effet sur le côlon moyen et distal (Li et al., 2002).

Les CGMs ne sont pas connues pour se produire dans les bandelettes du muscle du côlon humain et du chien. Cependant, une étude effectuée par Gonzalez et Sarna (2001b) indique que les bandelettes circulaires du côlon moyen de rat génèrent des CGs régulières ainsi que des contractions phasiques. A l'inverse des bandelettes du côlon moyen, celles du côlon proximal et distal génèrent rarement des CGs. La fréquence des CGs dans le côlon moyen est de 0.3 ± 0.1 contractions/minute. Selon ces auteurs, les CGs sont des contractions dont la durée est supérieure à 150% et l'amplitude est supérieure à 300% des valeurs moyennes des contractions phasiques correspondantes. Les CGs sont parfois superposées à des contractions phasiques, particulièrement dans leur phase de relaxation (Gonzalez et Sarna, 2001b). Dans les bandelettes musculaires, les contractions phasiques et les CGs sont insensibles à l'atropine 1 μ M. Par contre, l'enlèvement de la muqueuse et de la sous-muqueuse du côlon moyen de rat bloque complètement les contractions phasiques spontanées, mais n'a aucun effet sur la fréquence des CGs (Gonzalez et Sarna, 2001b), ce qui confirme que les CGs ne sont pas réglées par les ondes lentes ou les ICCs (Sarna, 1987). De même, l'inhibition des canaux Na^+ par la TTX et les canaux Ca^{2+} de type N par le ω -conotoxine augmente la fréquence et l'amplitude des CGs du côlon moyen de rat. A l'inverse des CGMs, la génération des CGs est indépendante de la libération des neurotransmetteurs (ACh, 5-HT, histamine et TKs), du fait que l'antagonisme de leurs récepteurs n'a pas d'effet sur la fréquence et l'amplitude des CGs (Gonzalez et Sarna, 2001a). Ce type de contraction a été aussi décrit dans le muscle longitudinal et circulaire du côlon distal de lapin (McKirdy, 1972). La présence des contractions phasiques et des CGs a été

également rapportée par d'autres auteurs chez le rat, la souris et le côlon humain avec la même gamme de fréquences que dans la présente étude (Rae et al., 1998; Bush et al., 2000; Bossone et al., 2001; Gonzalez et Sarna, 2001b; Buharalioglu et Akar, 2002; Alberti et al., 2005; Gallego et al., 2006). Plujà et ses collaborateurs (2001) ont rapporté que les bandelettes circulaires du côlon de rat montrent une activité mécanique cyclique composée de deux types de contractions: des contractions de faibles fréquences (0.5-1.5 contractions/minute) et d'amplitude élevée et des contractions de fréquences élevées (13-15 contractions/minute) et de faible amplitude. Selon ces auteurs, le premier type de contractions est enregistré avec des préparations avec le plexus d'Auerbach intact et le second avec des préparations avec le plexus sous-musculaire intact.

5.4. Les contractions toniques

La contraction musculaire peut être induite par plusieurs molécules pharmacologiques, les plus souvent utilisées sont l'ACh ou ses agonistes muscariniques (carbachol, métacholine, oxotrémorine), le KCl, l'histamine, le BaCl₂, etc. Le carbachol et le KCl induisent la contraction tonique des préparations musculaires du côlon proximal de rat (Takeuchi et al., 2001). Quel que soit le stimulus qui a induit la contraction tonique (ACh, carbachol ou KCl), cette dernière est due à l'augmentation de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire suite à son influx transmembranaire via les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants (Takeuchi et al., 2001; McCarron et al., 2002). Le blocage de ce type de canaux (nicardipine, nifédipine, vérapamil) inhibe la contraction tonique du muscle lisse du côlon proximal de rat, du fundus de rat et de l'intestin grêle de lapin (Takeuchi et al., 2001; Buharalioglu et Akar, 2002; Grasa et al., 2004). En outre, la suppression du Ca²⁺ externe empêche la contraction induite par le KCl (Buharalioglu et Akar, 2002).

5.5. Le péristaltisme et la propulsion

Le péristaltisme, impliquant des réflexes nerveux entériques mettant en jeu principalement le plexus d'Auerbach, résulte des contractions coordonnées des couches musculaires longitudinales et circulaires et qui se propage dans la direction aborale pour propulser le contenu de la lumière de l'intestin ou du côlon (Bennett et al., 1976; Waterman et al., 1994; Smith et Robertson, 1998). Le péristaltisme est produit par le remplissage lent de la lumière du côlon par le fluide (Smith et Robertson, 1998). La coordination entre les deux muscles s'appuierait aussi sur une activité pacemaker manifestée par des ondes électriques lentes engendrées par les myocytes intestinaux mais dont l'origine serait dans les ICCs (Poitras, 1998). Ce modèle moteur est régi par des voies ascendantes excitatrices (contraction) et des voies descendantes inhibitrices (relaxation) dans le système nerveux entérique (Waterman et al., 1994). Les deux voies jouent un rôle crucial dans la coordination et la propagation des ondes péristaltiques (Holzer et al., 1997). Le péristaltisme dans le côlon dépend des réflexes nerveux entériques puisqu'il est bloqué par la TTX ou l'hexaméthonium

(Crema et al., 1970; Mackenna et McKirdy, 1972). Il consiste en l'activation des reflexes nerveux excitateurs ascendants et inhibiteurs descendants (Smith et Robertson, 1998). De plus, l'ATP réduit la vitesse de la propulsion dans les segments isolés du côlon de lapin (Tonini et al., 1982). Dans le côlon distal de lapin, le N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) 30 et 300 μ M diminue la période de latence des ondes péristaltiques et augmente la vitesse de la propulsion d'un ballon intraluminal distendu. Une combinaison de L-NNA et d'apamine bloque le péristaltisme, en raison des spasmes persistants du muscle circulaire (Ciccocioppo et al., 1994; Holzer et al., 1997). Dans la même partie du côlon et chez la même espèce, les récepteurs des neurokinines (NK₂ et NK₃) ralentissent la propulsion par activation d'un mécanisme neuronale NO-dépendant et peuvent l'accélérer par une interaction synergique respectivement avec les récepteurs cholinergiques muscariniques et nicotiniques (Onori et al., 2000, 2001).

5.6. Les propriétés électriques de la musculuse

Les muscles lisses intestinaux montrent des dépolarisations cycliques appelées ondes lentes qui sont initiées dans les ICCs et se propagent via les jonctions communicantes (Thuneberg, 1982). Les ondes lentes produites par le réseau des ICCs à la frontière sous-muqueuse diffusent passivement à travers les jonctions de type communicantes dans la majeure partie du muscle circulaire, et celles produites à la frontière myentérique diffusent passivement dans le muscle longitudinal et circulaire. La perte des ICCs conduit à la perte de la rythmicité électrique normale du muscle du tractus gastrointestinal du fait que les ondes lentes sont le signal qui organise le comportement contractile de ces muscles (Sanders et al., 2002). Les fibres du muscle circulaire sont reliées par les jonctions communicantes qui transmettent le courant électrique des ondes lentes d'une fibre à une autre (Wood, 2003; Daniel, 2004).

Dans la couche musculaire circulaire du côlon du lapin et du chat, les ondes lentes apparaissent sous forme de dépolarisations et de repolarisations rythmiques du potentiel de la membrane et sont associées aux contractions phasiques (Bielefeld et al., 1990) (Fig. 6).

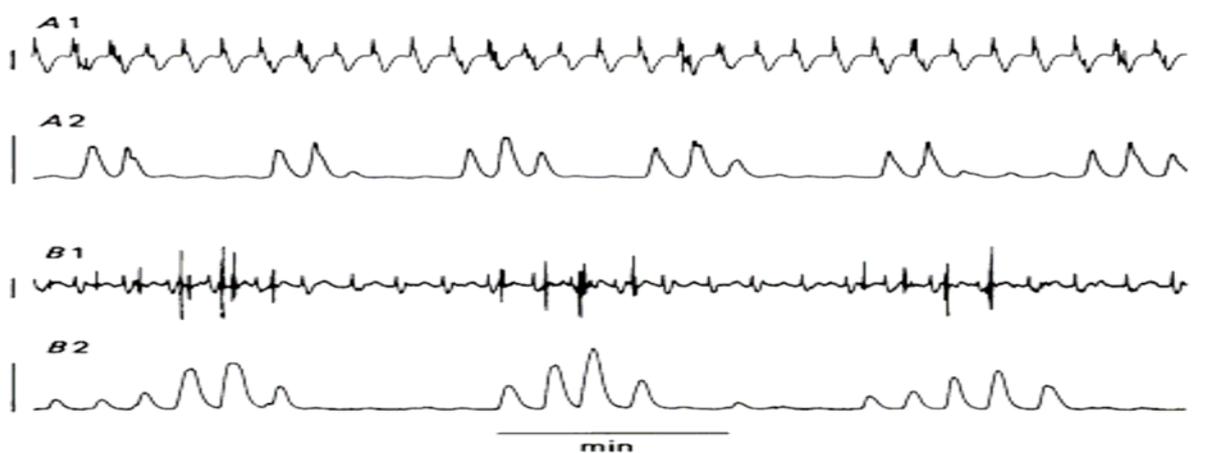
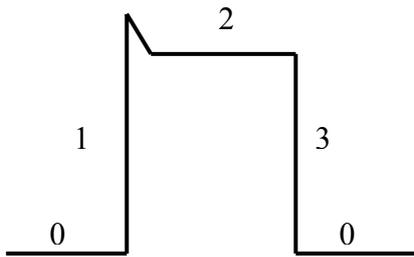


Figure 6. L'activité électrique (A1 et B1) et mécanique (A2 et B2) du muscle lisse circulaire du côlon proximal (A) et moyen (B) de chien (el-Sharkawy, 1983).

Dans les muscles gastro-intestinaux, les ondes lentes se produisent en quatre phases déterminées par des mécanismes ioniques spécifiques (Wood, 2003):



- La phase 0: potentiel de repos de la membrane qui correspond au courant sortant de K^+ .
- La phase 1: c'est la phase de dépolarisation et correspond à l'activation des canaux Ca^{2+} et K^+ voltage-dépendants.
- La phase 2: c'est la phase du plateau et correspond à l'équilibre entre le courant entrant du Ca^{2+} et le courant sortant du K^+ .
- La phase 3: c'est la phase de repolarisation et correspond à l'inactivation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et à l'activation des canaux K^+ calcium-dépendants (K_{Ca}).

Les ondes ont une fréquence constante et varie en fonction de la région du tube digestif (Sanders et al., 2002; Vergara et al., 2003). Leur fréquence est de 3/minute dans l'antra, 18/minute dans le duodénum et de 6 à 10/minute dans le côlon. La fréquence contractile maximale du muscle n'excède pas la fréquence des ondes lentes, mais elle peut se produire à une fréquence plus basse du fait que les ondes lentes ne sont pas toutes productives de contractions (Wood, 2003).

L'initiation de l'activité pacemaker dans les ICCs est induite par la libération du Ca^{2+} à partir du réticulum sarcoplasmique (Sanders et al., 2006) puisque les agents qui inhibent la libération du Ca^{2+} intracellulaire et la prise du Ca^{2+} par la mitochondrie bloquent l'activité des ondes lentes (Ward et al., 2003).

Les ondes lentes sont générées au niveau du muscle lisse circulaire du côlon par des changements cycliques de la conductibilité de la membrane qui dépendent de la présence du Ca^{2+} extracellulaire et du potentiel membranaire (Barajas-Lopez et al., 1989; Rae et al., 1998). La libération du Ca^{2+} intracellulaire à partir du réticulum sarcoplasmique et la manipulation du Ca^{2+} mitochondrial sont aussi nécessaires à la régénération (propagation active) des ondes lentes (Ward et al., 2003).

Les activités électrique et motrice du côlon du chien peuvent être expliquées par deux composantes principales: l'une résultant de la couche musculaire longitudinale (oscillations de fréquences élevées et contractions toniques) et l'autre de la couche circulaire (ondes lentes et contractions phasiques), chaque période d'activité électrique étant associée à une contraction tonique prolongée (el-Sharkawy, 1983).

Les complexes moteurs migrants (CMMs) constituent un modèle distinct d'activité électrique et mécanique dans les couches musculaires lisses du tractus gastro-intestinal. Ils consistent habituellement en une contraction soutenue qui se propage en grande partie dans le sens oro-anal. Les CMMs peuvent se produire dans l'estomac, l'intestin grêle (CMMIs) et le côlon (CMMCs) (Spencer, 2001). L'initiation et la propagation de ces CMMs dépendent du système nerveux entérique (Bush et al., 2000). Le CMMI et le CMMC de la souris sont d'origine neuronale; ils sont supprimés par la TTX, inhibiteur des canaux sodiques et l'hexaméthonium, antagoniste nicotinique, et réduits par l'application de l'atropine, antagoniste des récepteur muscariniques (Fida et al., 1997; Powell et Bywater, 2003). La couche musculaire circulaire des segments du côlon de la souris génère des contractions périodiques qui se propagent de la région proximale à la région distale (Bush et al., 2000). La nifédipine, bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L, diminue significativement l'amplitude des CMMCs mais sans affecter leur fréquence, indiquant une activation de ces canaux durant chaque CMMC (Fida et al., 1997). Le NO peut être impliqué dans le maintien de l'inhibition du muscle lisse durant l'intervalle qui sépare les CMMCs du fait que l'inhibition de la NOS n'a aucun effet sur l'amplitude des contractions du CMMC de la souris mais abrège significativement cet intervalle (Fida et al., 1997; Powell et Bywater, 2001).

6. Le contrôle de la contraction

Le stockage, le transport et l'évacuation du contenu du côlon sont assurés par la coordination de l'activité du muscle lisse régulée par l'interaction complexe entre des mécanismes myogènes et des mécanismes neurogènes. La régulation neuronale de la motilité colique est assurée par les divisions du système nerveux autonome. Au niveau local, le réseau des neurones localisé dans la paroi gastro-intestinale forme le système nerveux entérique. A un niveau plus élevé, les réflexes péristaltiques coordonnent l'activité des régions intestinales par les neurones dans le ganglion pré-vertébral. La motilité colique est aussi sous l'influence du système nerveux central via les connexions neuronales contenues dans les nerfs parasympathiques excitateurs et sympathiques inhibiteurs innervant l'intestin.

6.1. Le contrôle extrinsèque de la contraction

L'innervation extrinsèque du tube digestif est assurée par le système nerveux autonome qui comporte la division sympathique et la division parasympathique (Fig. 7). Elle implique généralement le nerf vague pour l'estomac et l'intestin grêle, les nerfs splanchniques pour l'estomac et l'intestin et le nerf pelvien pour l'intestin distal (Nilsson, 1983).

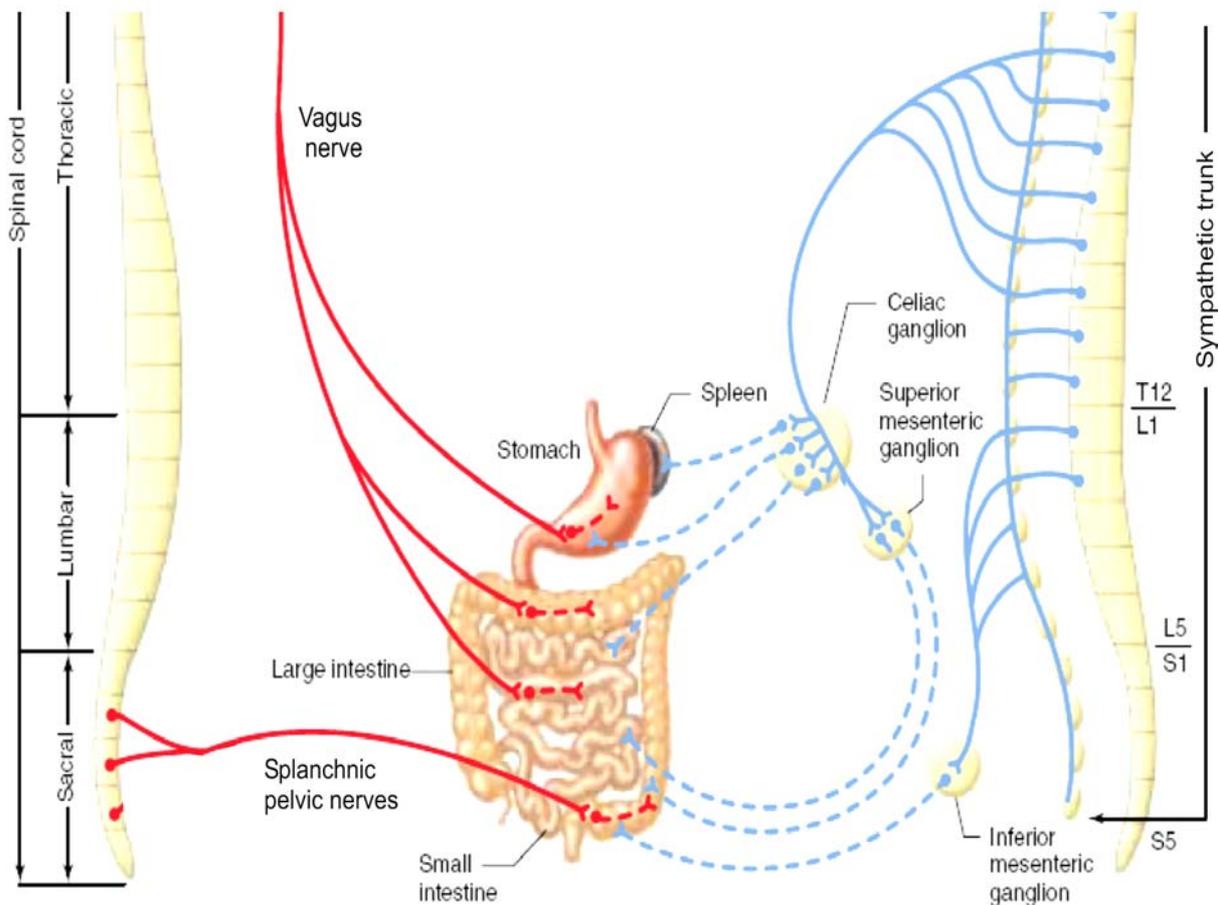


Figure 7. Les divisions parasympathique (à gauche) et sympathique (à droite) du système nerveux autonome. Les ganglions cœliaque, mésentérique supérieur et mésentérique inférieur sont des ganglions collatéraux. Seulement un seul tronc sympathique est indiqué, bien qu'il existe deux, un de chaque côté de la moelle épinière (Vander et al., 2001).

6.1.1. L'innervation parasympathique

Les neurones pré-ganglionnaires dans le noyau parasympathique sacré aux niveaux des régions intermedio-latérales de la moelle épinière sacrée constituent la source des fibres efférentes qui contrôlent les fonctions du côlon (De Groat et al., 1982). Les fibres efférentes parasympathiques émergent de la moelle épinière dans la deuxième et la troisième racine ventrale sacrée, puis passent de façon périphérique dans une branche du nerf pelvien au plexus pelvien et au côlon (Venkova et al., 2003). La région distale du côlon reçoit une innervation parasympathique extrinsèque par le nerf pelvien (McRorie et al., 1991) alors que la partie proximale reçoit une entrée parasympathique supplémentaire à travers les branches distales du nerf vague (Gonella et al., 1987; Furness et Bornstein, 1991). Plusieurs études ont montré que le noyau dorsal moteur du vague se projette dans le côlon proximal du rat (Altschuler et al., 1993), du chat (Satomi et al., 1978) et du chien (Hudson, 1990) avec une diminution remarquable dans le nombre des cellules qui se projettent dans le côlon distal (Tarakçi et Vaillant, 1999).

En plus des neurones sensoriels intrinsèques (entériques), il y a deux groupes de neurones afférents primaires extrinsèques qui innervent l'intestin: les neurones afférents du nerf vague et les neurones afférents spinaux (Holzer et al., 2001). De 80 à 90% des axones du nerf vague sont des fibres nerveuses sensorielles afférentes. Les afférences spinales atteignent l'appareil gastro-intestinal via les nerfs splanchnique et pelvien dans lequel ils constituent de 10 à 30% des fibres nerveuses totales (Sengupta et Gebhart, 1994). Dans le tractus gastro-intestinal, les terminaisons des afférences vagale et spinale se projettent dans la séreuse, le plexus myentérique, le muscle, la sous-muqueuse et la muqueuse (Furness et Clerc, 2000).

6.1.2. L'innervation sympathique

Les nerfs sympathiques constituent l'innervation extrinsèque principale du côlon proximal (Gonella et al., 1987; Furness et Bornstein, 1991). Les fibres sympathiques post-ganglionnaires qui contrôlent l'activité contractile du côlon ont leur origine dans le ganglion mésentérique inférieur et dans le ganglion para-vertébral et se déplacent vers le côlon dans les nerfs coliques lombaires (De Groat et Krier, 1979). Il est bien établi que le ganglion cœliaque envoie des projections principalement à l'estomac et à l'intestin grêle avec une projection mineure au côlon proximal, considérant que le gros intestin reçoit son innervation sympathique principalement à partir du ganglion mésentérique inférieur (Kreulen et Szurszewski, 1979; Shu et al., 1988). Par contre, la partie la plus distale du côlon reçoit une innervation sympathique à travers les nerfs hypogastriques (Baron et al., 1985).

6.2. Le contrôle intrinsèque de la contraction

Les corps cellulaires des neurones du système nerveux entérique sont regroupés dans des ganglions reliés les uns aux autres par des réseaux de fibres constituant le plexus de Meissner et le plexus d'Auerbach (Fig. 8).

L'ACh est le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux entérique (Holzer et al., 2001). Il participe dans la transmission rapide à travers ses récepteurs nicotiques et dans la transmission lente via ses récepteurs muscariniques (Holzer et al., 2001; Furness et Sanger, 2002). Les antagonistes cholinergiques inhibent, au moins en partie, tous les potentiels synaptiques excitateurs des neurones entériques S et AH (Galligan, 2002). L'ACh, en agissant sur ses récepteurs neuronaux, active la conductance non spécifique des cations, y compris la perméabilité au Ca^{2+} (Hansen, 2003b). Les récepteurs de l'ACh sont localisés au niveau des interneurons et des motoneurons. Les neurones pré-synaptiques expriment aussi des récepteurs cholinergiques qui permettent la libération du neurotransmetteur au niveau des ganglions myentériques et des jonctions neuro-effectrices (Galligan, 2002). L'ACh libérée réagit avec ses récepteurs spécifiques localisés sur la cellule musculaire ou est hydrolysée dans la fente synaptique par l'action de l'acétylcholine estérase. L'inhibition de l'acétylcholine estérase par des inhibiteurs spécifiques (physostigmine, néostigmine, etc.) entraîne l'accumulation de l'ACh dans les jonctions neuromusculaires pour stimuler la contraction (Sawyer et al., 2000; Baldassano et al., 2008).

L'ACh agit principalement via les récepteurs muscariniques M_2 et M_3 (Fig. 9). Elle stimule les récepteurs M_3 , qui sont couplés à la protéine $G_{q/11}$ et stimulent la phospholipase C β (PLC_β), pour induire la contraction directe du muscle via la production d'inositol 1,4,5- triphosphate (IP_3) et du diacylglycérol (DAG) (Uchiyama et Chess-Williams, 2004). La PLC_β active la formation de l' IP_3 et du DAG. Par activation de ses récepteurs, l' IP_3 libère le Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique via les récepteurs sensibles à la ryanodine (Sawyer et Ehlert, 1998; Cook et al., 2000), alors que le DAG active la protéine kinase C (PKC) (Gomez-Munoz et al., 2001).

L'ACh induit aussi la contraction du muscle lisse indirectement via les récepteurs M_2 . Ces derniers sont couplés à la protéine G_i et inhibent la production de l'AMPc par inhibition de l'adényl cyclase. En plus de l'ACh, le carbachol, agoniste des récepteurs cholinergiques induit la contraction du muscle lisse du côlon distal de cobaye par activation des récepteurs muscariniques M_3 couplés à la protéine G_q (Kobayashi et al., 2001; McCarron et al., 2002). En présence d'hexaméthonium, bloqueur des récepteurs nicotiques ganglionnaire, la réponse des bandelettes circulaires du côlon distal du rat à l'ACh est augmentée significativement (Hosseini et al., 1999). Par contre, le diméthyl phénylpipérazine (DMPP), agoniste des récepteurs ganglionnaires nicotiques, relâche le muscle lisse du côlon distal (Börjesson et al., 1997).

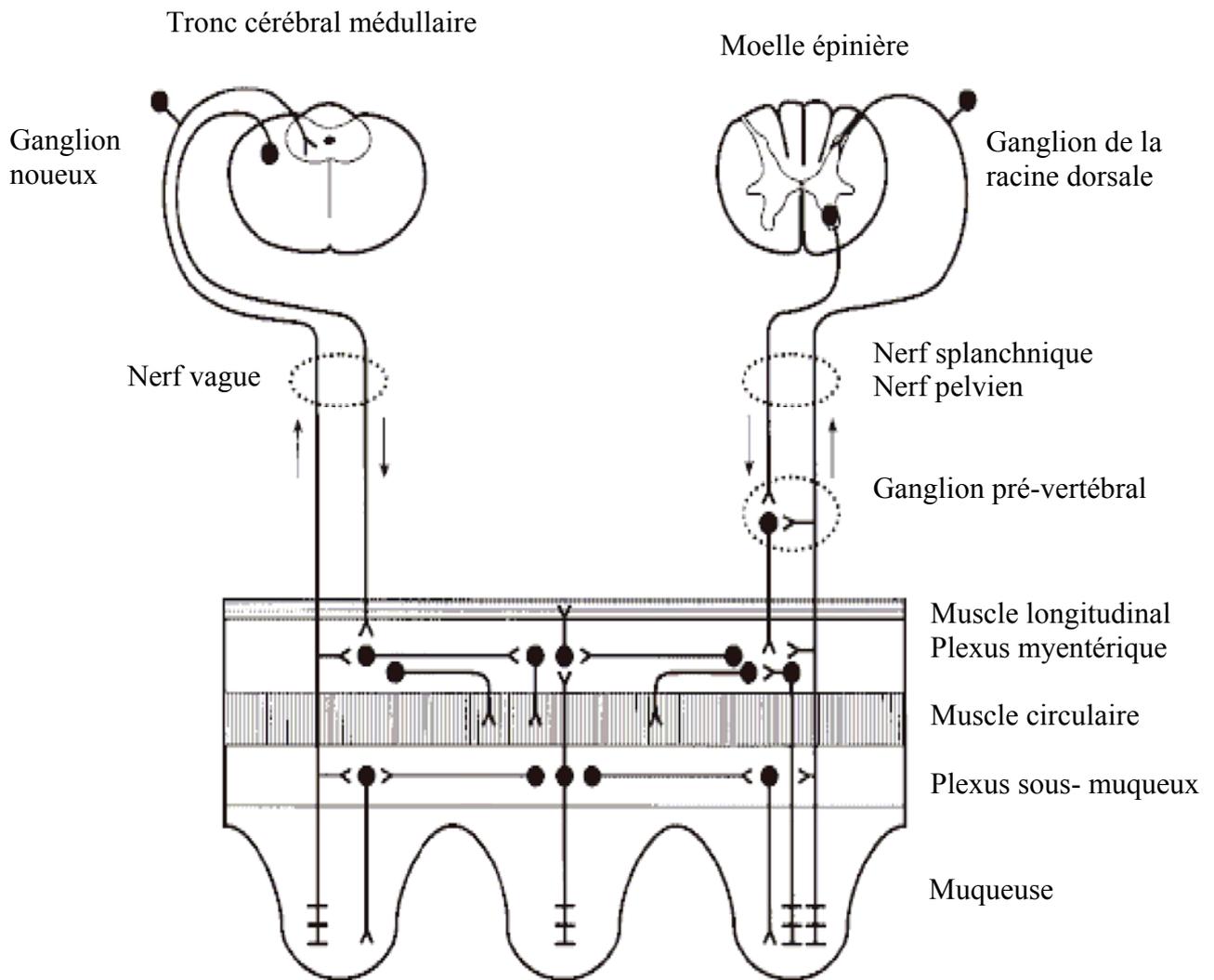


Figure 8. Diagramme schématisant l'innervation multiple du tractus gastro-intestinal par les neurones entériques dans le plexus myentérique et le plexus sous muqueux, les neurones extrinsèques sensoriels provenant du ganglion noueux (afférences vagales) et du ganglion de la racine dorsale (afférences spinales) et les neurones efférents autonomiques du système nerveux parasympathique (nerfs vague et pelvien) et le système nerveux sympathique (nerfs splanchniques) (Holzer et al., 2001).

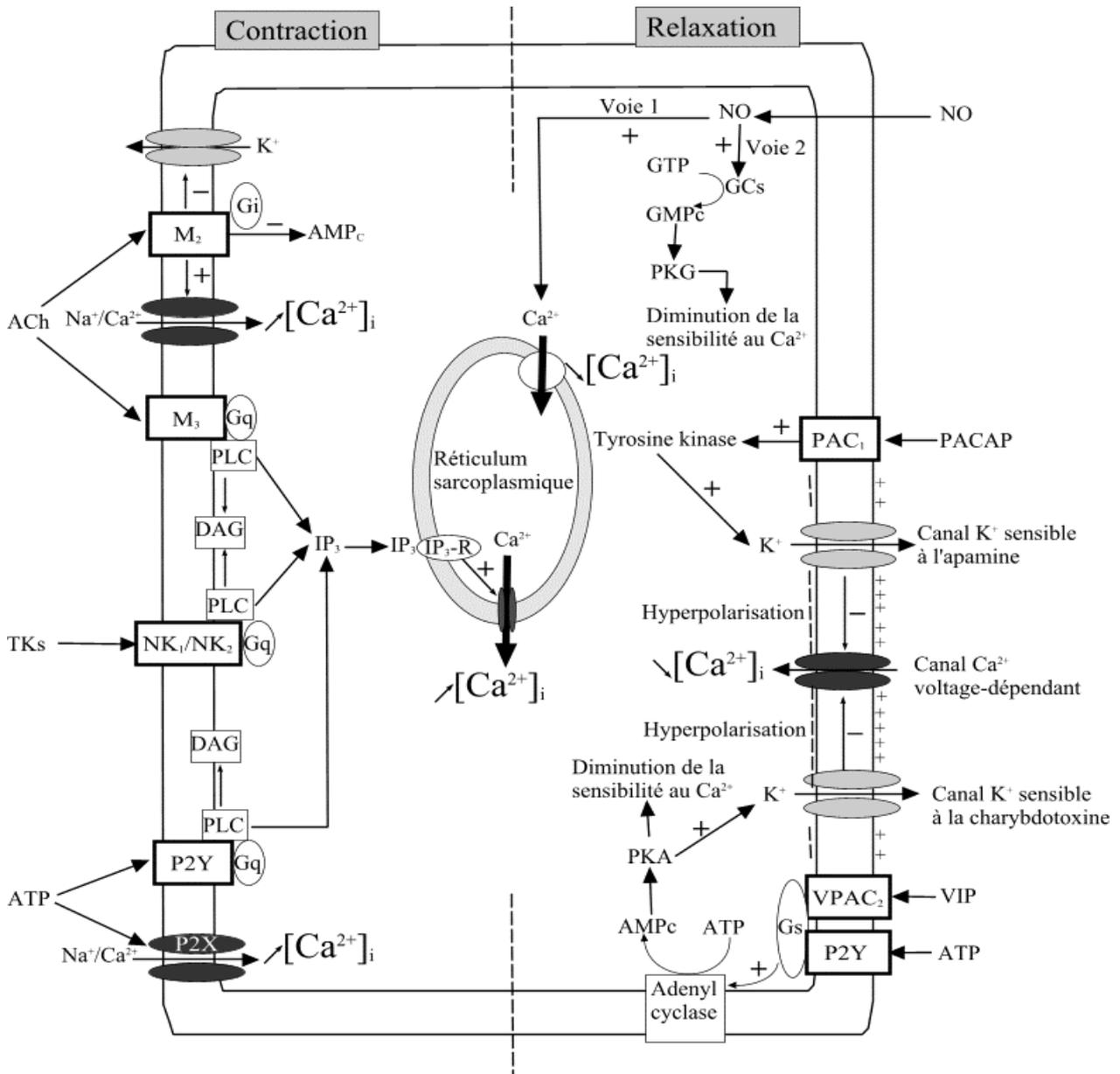


Figure 9. Les cellules musculaires lisses intestinales sont la cible de la transmission neuromusculaire excitatrice (ACh, TKs et ATP) et inhibitrice (NO, VIP, PACAP et ATP). L’ACh stimule les récepteurs M₃ pour induire la contraction directe du muscle lisse via l’IP₃ et le DAG. Il induit la contraction indirectement via les récepteurs M₂ par inhibition de la production de l’AMPc. Les récepteurs M₂ peuvent inhiber les canaux K⁺ et ouvrent les canaux cationiques non spécifiques. Le NO induit la relaxation par diminution de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire via l’activation de la séquestration du Ca²⁺ par le réticulum sarcoplasmique. L’augmentation de la concentration du GMPc peut induire la relaxation par diminution de la sensibilité du Ca²⁺. Le VIP et le PACAP induisent la relaxation par diminution de la concentration du Ca²⁺ intracellulaire par activation des canaux K_{Ca}. Le VIP active les canaux K⁺ sensible à la charybdotoxine par la voie de la PKA. Le PACAP active les canaux K⁺ sensible à l’apamine par la voie de la tyrosine kinase. L’activation des canaux K⁺ hyperpolarise la membrane cellulaire et ferme les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants. La forte concentration de l’AMPc peut contribuer à la relaxation par diminution de la sensibilité du Ca²⁺ (Voie 2). Les récepteurs du VIP et du PACAP sont classés en trois types: PAC1 ayant une grande affinité pour le PACAP et une faible affinité pour le VIP et VPAC1 et VPAC2 dont leur affinité est la même pour les deux neurotransmetteurs (Hata et al., 2000; Uchiyama et Chess-Williams, 2004).

Les TKs constituent une famille de neuropeptides qui regroupe la substance P, la NK-A et la NK-B qui activent préférentiellement et respectivement les récepteurs NK₁, NK₂ et NK₃ (Lecci et al., 2002). Ces neuropeptides sont détectés dans plusieurs classes de neurones myentériques et sont impliqués dans la transmission neuronale et neuromusculaire excitatrice (Holzer et al., 2001). Les récepteurs NK₁ semblent être localisés dans les neurones myentériques cholinergiques et nitroergiques et sur les cellules musculaires. Alors que les récepteurs NK₂ sont localisés seulement sur les cellules musculaires du côlon proximal de souris et de rat (Mulè et al., 2000; Mulè et al., 2007). La substance P, la NK-A et la NK-B induisent une augmentation de l'amplitude de la contraction spontanée du muscle lisse du côlon proximal du cobaye (Ishikawa et Ozaki, 1997). L'application de la substance P et de la NK-A induit la dépolarisation et la contraction du muscle lisse circulaire du duodénum de cobaye, du côlon sigmoïde humain et de l'iléon des hamsters (Zagorodnyuk et al., 1995; Cao et al., 2000; El-Mahmoudy et al., 2003). La NK-A active les récepteurs NK₂ liés à la protéine G_q qui induit la libération du Ca²⁺ et par conséquent la contraction (Fig. 9). La thapsigargine, inhibiteur de la Ca²⁺-ATPase du réticulum sarcoplasmique, abolit la contraction induite par la NK-A, suggérant que la contraction nécessite la libération du Ca²⁺ intracellulaire (Cao et al., 2000).

La 5-HT induit la relaxation ou la contraction du muscle lisse gastro-intestinal selon le type de récepteur activé. Les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₄ sont détectés dans diverses régions du tractus intestinal du cobaye, du rat et de la souris, y compris le jéjunum, l'iléon, le côlon proximal et le côlon distal (Briejer et al., 1995; Gelal et Guven, 1998; Chetty et al., 2006). L'activation des récepteurs 5-HT₄ augmente la fréquence des contractions spontanées du muscle longitudinal du côlon distal du rat (Ono et al., 2005). Par contre, dans le muscle lisse circulaire du côlon humain, les récepteurs 5-HT₄ avec les récepteurs 5-HT₇ sont impliqués dans la transmission inhibitrice (Prins et al., 2000; Irving et al., 2007). L'application de l'atropine, de la TTX et des antagonistes sélectifs des récepteurs 5-HT montre que ce neurotransmetteur induit la contraction du côlon via les récepteurs 5-HT₂ situés sur le muscle lisse et les récepteurs 5-HT₃ et 5-HT₄ situés sur les neurones cholinergiques. De ce fait, la 5-HT stimule la contraction du côlon de plusieurs espèces par la libération de l'ACh dans les jonctions neuromusculaires et par un effet direct sur le muscle lisse (Briejer et al., 1995; Gelal et Guven, 1998; Prins et al., 2000).

L'ATP, via les récepteurs P2X et P2Y, joue aussi un rôle important dans la transmission neuro-neuronale excitatrice au niveau du muscle longitudinal et circulaire (Spencer et al., 2000; Furness et Sanger, 2002). L'ATP est impliquée dans la transmission rapide à travers les récepteurs P2X (Holzer et al., 2001). Dans les cellules musculaires lisses gastriques du lapin, la contraction induite par l'ATP est abolie par l'inhibition de la PLC et elle est réduite par la toxine pertussique, indiquant la participation des récepteurs P2Y de l'ATP dans cette réponse (Murthy et Makhoul, 1998) (Fig.

9). Par ailleurs, l'ATP est libérée par les motoneurones inhibiteurs au niveau du côlon du chien, du rat et de l'homme et induit la relaxation du muscle lisse consécutive à l'hyperpolarisation rapide des cellules (Okamura et al., 1998; Plujà et al., 1999; Gallego et al., 2006) (Fig. 9). En plus de l'ATP, le système nerveux entérique exprime d'autres neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le NO, le VIP et le PACAP.

Plusieurs études révèlent que le NO est un neurotransmetteur au niveau du côlon de plusieurs espèces (Suthamnatpong et al., 1993a; Ciccocioppo et al., 1994; Venkova et Krier, 1994; McKirdy et al., 2004). Le NO est un neurotransmetteur NANC et agit comme un neurotransmetteur inhibiteur (Xue et al., 2000). Dans le système nerveux entérique, le NO est produit dans les neurones entériques à partir de la L-arginine par la NOS. Les cellules neuronales exprimant la NOS sont localisées dans le plexus myentérique entre les couches circulaire et longitudinale du côlon proximal, moyen et distal du rat, la plus forte densité étant trouvée dans la région moyenne (Alberti et al., 2005). L'inhibition de la NOS par le N-nitro-L-arginine (L-NOARG) et le L-NAME augmente la fréquence et l'amplitude des contractions du muscle circulaire du côlon de rat (Plujà et al., 1999). Le NO, produit par la NOS, diffuse vers les cellules musculaires lisses adjacentes où il induit l'hyperpolarisation et la relaxation du muscle par des mécanismes dépendants et indépendants du GMPc (Franck et al., 1997; Xue et al., 2000) (Fig. 9). Le NO augmente le taux de GMPc du côlon proximal et distal du rat et du chien (Suthamnatpong et al., 1993b; Franck et al., 1997). En effet, l'activation de la guanyl cyclase par le NO augmente la concentration du GMPc qui provoque la relaxation du muscle par diminution de la sensibilité au Ca^{2+} , une diminution de la sensibilité consécutive à sa séquestration par le réticulum sarcoplasmique (Hata et al., 2000). De même et dans le muscle lisse circulaire du côlon distal du lapin, le NO augmente la sortie du K^+ par activation des canaux K_{Ca} par la voie du GMPc (Lu et al., 1998). L'hyperpolarisation et la relaxation du côlon proximal du chien ainsi que celle du côlon distal du rat induite par le sodium nitroprussiate (SNP), donneur de NO, sont abolies à la suite de l'inhibition de la guanyl cyclase par le 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one (ODQ) (Franck et al., 1997; Börjesson et al., 1999). De plus, l'inhibition de la guanyl cyclase soluble par le bleu de méthylène diminue l'effet relaxant du NO sur le muscle lisse du côlon de lapin (Lu et al., 1998).

Le VIP et le PACAP induisent l'hyperpolarisation du muscle lisse circulaire du côlon du rat (Plujà et al., 2000) (Fig. 9). En outre, le VIP est capable d'induire la relaxation via la stimulation de la génération du NO (Grider et al., 1992; Mashimo et al., 1996). Cependant, dans le côlon distal du rat, le VIP n'augmente pas le taux de GMPc (Suthamnatpong et al., 1993b) mais augmente le taux d'AMPc dans le côlon proximal (Hata et al., 2000). Le VIP augmenterait transitoirement la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, ce qui active les canaux K^+ et par conséquent la relaxation du muscle lisse (Keef et al., 1994).

7. Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses constituent l'effecteur final du développement de la force contractile. Cependant, elles reçoivent l'entrée régulatrice à partir de plusieurs systèmes de contrôle, y compris les ICCs, les motoneurones, les hormones, les substances paracrines et les médiateurs de l'inflammation (Sanders, 2008). 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 (Gabella et Blundell, 1981; Nakamura et al., 1998). Les ICCs et les cellules musculaires lisses sont couplées électriquement formant un syncytium multicellulaire. L'activation des conductances ioniques dans l'un ou l'autre type cellulaire affecte l'excitabilité totale du syncytium. Par exemple, l'activation des canaux K^+ dans les ICCs réduit l'excitabilité des cellules musculaires lisses couplées et réduit la probabilité d'atteindre le seuil du potentiel d'action (Sanders, 2008).

7.1. L'activité électrique et les canaux ioniques

Les régions gastro-intestinales montrent une activité électrique phasique due à l'activité pacemaker des ICCs qui génèrent une activité pacemaker sous forme d'ondes lentes électriques se propagent activement à travers le réseau de cellules (Sanders et al., 2006). Les ondes lentes sont conduites passivement dans les cellules musculaires lisses où la dépolarisation augmente la probabilité d'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Sanders, 2008).

Les phénomènes moléculaires de la contraction des fibres musculaires lisses nécessitent la présence du Ca^{2+} . L'augmentation de sa concentration intracellulaire est due à la pénétration du Ca^{2+} extracellulaire après dépolarisation de la membrane, après distorsion mécanique ou après stimulation par des agonistes. La libération du Ca^{2+} intracellulaire stocké dans le réticulum sarcoplasmique constitue un deuxième moyen pour l'élévation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (Bolton et al., 1999; Sanders, 2001; Al-Jarallah et al., 2008).

7.1.1. Les voies d'entrée du Ca^{2+} extracellulaire

Le Ca^{2+} pénètre dans la cellule musculaire à travers les canaux calciques voltage-dépendants, les canaux cationiques non sélectifs, les canaux Ca^{2+} activés par la libération du Ca^{2+} et les canaux cationiques non sélectifs sensibles à l'étirement.

7.1.1.1. Les canaux calciques voltage-dépendants

Il y a six types de canaux calciques voltage-dépendants: L, N, P, Q, R et T (Karaki et al., 1997). Dans le muscle lisse, seuls les canaux de type L sont considérés comme une voie importante pour l'influx du Ca^{2+} (Vogalis et al., 1991). Ces canaux, présents dans le muscle lisse du côlon du rat

(Liu et al., 2001), de la souris (Powell et al., 2002) et du cobaye (Santicioli et al., 1999), sont activés par la dépolarisation de la membrane et inhibés par les bloqueurs des canaux calciques. Les agonistes des canaux calciques ouvrent ces canaux par dépolarisation de la membrane cellulaire via l'activation des canaux cationiques non sélectifs (Sanders, 2001, 2008). Beaucoup de Ca^{2+} qui active la contraction du muscle lisse pénètre dans les cellules durant la dépolarisation de la membrane plasmique via les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants sensibles à la dihydropyridine (DHP). Ces canaux sont activés par la dépolarisation de la membrane plasmique de la cellule musculaire lisse induite par l'activation des canaux cationiques non sélectifs (Sanders, 2001). Ils jouent un rôle essentiel dans le couplage excitation-contraction des cellules musculaires lisses, bien que ces canaux ne soient pas impliqués dans la génération de l'activité électrique des ICCs (Nakayama et al., 2007).

7.1.1.2. Les canaux cationiques non sélectifs

Les agonistes endogènes activent les courants cationiques ainsi que les courants de Ca^{2+} chlore-dépendants dans les muscles lisses. Les deux courants peuvent contribuer à l'entrée du Ca^{2+} via la dépolarisation de la membrane cellulaire et à l'activation des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Sanders, 2001). Ces canaux sont détectés dans le muscle lisse de l'iléon (Inoue et Isenberg, 1990) et du côlon (Lee et al., 1993). La contraction du muscle lisse gastro-intestinal par la stimulation cholinergique M_2 et M_3 nécessite une activation des canaux cationiques non sélectifs (Wang et al., 1997), la dépolarisation de la membrane qui en résulte qui stimule l'entrée du Ca^{2+} et la contraction du muscle lisse (Janssen et Sims, 1992).

7.1.1.3. Les canaux calciques activés par la libération du Ca^{2+}

Une autre voie pour l'influx du Ca^{2+} qui n'est pas inhibée par les bloqueurs des canaux Ca^{2+} est la voie de la pénétration capacitive du Ca^{2+} à travers les canaux activés par la libération du Ca^{2+} ou canaux commandés par la réserve (store-operated calcium channels, SOCC) (Sanders, 2001). L'ouverture des canaux SOCC est déclenchée par l'épuisement des réserves du Ca^{2+} et l'influx du Ca^{2+} résultant est appelé pénétration capacitive du Ca^{2+} (Wayman et al., 1998; Ohta et al., 2000). Dans les muscles lisses iléales du rat et du côlon distal du cobaye, l'entrée capacitive du Ca^{2+} est activée après l'épuisement transitoire des réserves du Ca^{2+} par le carbachol ou la caféine (Ohta et al., 1995; McCarron et al., 2002) et après l'épuisement continu par le prétraitement avec la thapsigargine ou la ryanodine (Tabo et al., 1996).

7.1.1.4. Les canaux cationiques non sélectifs sensibles à l'étirement

L'étirement mécanique ouvre les canaux cationiques non sélectifs dans les cellules musculaires lisses, ce qui peut activer la perméabilité des canaux Ca^{2+} dans le muscle lisse (Hisada et al., 1993; Sanders, 2001). Plusieurs études ont montré que l'activité contractile spontanée des bandelettes du

muscle lisse peut être induite par l'étirement qui ouvre les canaux Ca^{2+} de type L dans les cellules musculaires lisses du côlon humain (Huizinga et al., 1985; Farrugia et al., 1999) et du rat (Gonzalez et Sarna, 2001a).

7.1.2. Les voies de la libération du Ca^{2+} intracellulaire

En plus du Ca^{2+} extracellulaire, le Ca^{2+} intracellulaire joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la contraction musculaire. Le principal compartiment de stockage du Ca^{2+} est le réticulum sarcoplasmique (Sanders, 2001). Le réticulum sarcoplasmique du muscle lisse est doté de deux types de canaux différents pour la libération du Ca^{2+} : les récepteurs de la ryanodine et les récepteurs de l' IP_3 (Bolton et al., 1999; McCarron et al., 2002).

7.1.2.1. Les récepteurs de la ryanodine

Les récepteurs de la ryanodine sont présents dans le muscle lisse de l'iléon (Uyama et al., 1992), de la vessie (Herrera et al., 2000) et du côlon du cobaye (McCarron et al., 2002). Ils sont activés par le Ca^{2+} cytoplasmique et sont responsables de la libération du Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} (calcium-induced calcium release, CICR) (Herrera et al., 2000; Sanders, 2001; McCarron et al., 2002). L'application de la ryanodine provoque une élévation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire et de la tension des cellules musculaires lisses (Uyama et al., 1992). La caféine et la ryanodine, toutes les deux activateurs des récepteurs de la ryanodine, accélèrent la libération du Ca^{2+} , ce qui épuise et réduit la quantité de Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique (McCarron et al., 2002; Bolton, 2006). A des concentrations au-dessus de 10 μM , la ryanodine est un inhibiteur des récepteurs de la ryanodine; elle stimule l'état fermé de ces canaux pour inhiber la libération du Ca^{2+} à partir des réserves intracellulaires (Herrera et al., 2000; Hashitani et Suzuki, 2007).

7.1.2.2. Les récepteurs de l' IP_3

La stimulation du muscle lisse gastro-intestinal par des agonistes qui se lient aux récepteurs couplés à la protéine G_q active la PLC et le métabolisme du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PIP2) en IP_3 . L' IP_3 en se fixant aux domaines cytosoliques du récepteur (IP_3R) stimule la libération du Ca^{2+} stocké dans le réticulum sarcoplasmique à travers le canal récepteur (Bolton et al., 1999; Sanders, 2001; Nakayama et al., 2007). L'activation des IP_3R par leur ligand est réglée par le Ca^{2+} cytoplasmique selon un mode biphasique (Lino, 1990). L'activation d' IP_3R est potentialisée par les faibles concentrations de Ca^{2+} et inhibée par les concentrations élevées (Lino, 1990; Bezprozvanny et al., 1991).

7.1.3. Les canaux K^+

Les canaux K^+ constituent une famille ubiquitaire de protéines membranaires dans les cellules excitables et non excitables. Un certain nombre de ces canaux joue un rôle crucial dans les processus de signalisation cellulaire tel que la régulation de la contraction du muscle lisse. Les

canaux K^+ conduisent sélectivement le K^+ (10^{-6} à 10^{-8} ions/s) à travers la membrane cellulaire selon son gradient électrochimique (Shieh et al., 2000). Les différents types de canaux K^+ sont caractérisés par des sensibilités différentes au potentiel membranaire, au taux du Ca^{2+} intracellulaire et à la modulation par des agonistes (Vogalis, 2000).

Sur la base de la séquence primaire en acides aminés de la sous-unité contenant le pore, les canaux K^+ sont classés en: (1) canaux K^+ voltage-dépendants (Shaker-like) à six segments transmembranaires (S1-S6) et un seul pore et (2) canaux K^+ de rectification à deux segments transmembranaires et un seul pore (Ashcroft, 2000; Shieh et al., 2000).

7.1.3.1. Les canaux à six segments transmembranaires et un pore

Les canaux K^+ à six segments transmembranaires peuvent être encore subdivisés en six familles de gène. Ceux-ci comportent les canaux K^+ voltage-dépendants (K_v), trois sortes de canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (BK, IK, SK), les canaux KCNQ et les canaux Eag-like (Ashcroft, 2000; Shieh et al., 2000). Les canaux K_v , KCNQ et Eag-like sont en général fermés au potentiel de repos de la cellule, mais s'ouvrent en réponse à la dépolarisation membranaire (Ashcroft, 2000). Ces canaux sont formés de quatre sous-unités α arrangés en une structure tétramérique formant le pore (MacKinnon, 1991). L'entrée externe du pore du canal constitue un site de liaison pour les toxines et les bloqueurs des canaux K^+ (Goldstein et al., 1993; Pascual et al., 1995). Par contre, le vestibule interne du pore, composé de résidus des segments S5 et S6, constitue un site de liaison de la 4-aminopyridine (4-AP), du tétraéthylammonium (TEA) et de la quinidine (Choi et al., 1993; Lopez et al., 1994).

- **Les canaux K^+ voltage-dépendants**

Tous les muscles lisses du tractus gastro-intestinal y compris l'iléon et le côlon de plusieurs animaux tels que le lapin, la souris et le cobaye expriment des canaux K_v (Vogalis, 2000) dont la dépolarisation de la membrane est une étape essentielle pour induire un changement de conformation qui provoque l'ouverture du canal et l'écoulement des ions (Shieh et al., 2000; Vogalis, 2000). Les canaux K_v sont composés d'un pore formé de sous-unités α qui peuvent s'associer à un certain nombre de sous-unités β de différents types (Fig. 10a). Le segment S4 sert comme un capteur de tension et contient sept résidus chargés positivement (Ashcroft, 2000). Plusieurs canaux K_v s'activent et s'inactivent rapidement quand le potentiel membranaire devient plus positif (Shieh et al., 2000).

- **Les canaux K^+ calcium-dépendants**

Dans la plupart des cellules musculaires lisses, une élévation concomitante de Ca^{2+} intracellulaire à la dépolarisation de la membrane est accompagnée d'un grand courant sortant de K^+ (Vogalis, 2000). Une grande partie de ce courant est générée par l'ouverture des canaux de large conductance (BK_{Ca}) qui ont été trouvés dans tous les muscles lisses du tractus gastro-intestinal (DiChiara et Reinhart, 1997). Ces canaux comme les canaux K_v sont activés par la dépolarisation de la membrane cellulaire. L'influx du Ca^{2+} extracellulaire à travers les canaux voltage-dépendant de type L ou sa libération des réserves intracellulaires sont déterminants pour l'ouverture des canaux K^+ sensibles à l'apamine responsables de la relaxation du muscle longitudinal et circulaire (Mulè et al., 2002). Les canaux K_{Ca} contribuent à la repolarisation et à l'hyperpolarisation ultérieure (after hyperpolarisation) des neurones des vertébrés (Ashcroft, 2000).

Sur la base des propriétés biophysiques et pharmacologiques, les canaux K_{Ca} sont divisés en trois classes: les canaux K_{Ca} de large conductance (BK), de faible conductance (SK) et de conductance intermédiaire (IK) (Castle, 1999). Plusieurs études ont rapporté que le muscle lisse du côlon exprime ces trois types de canaux (Lu et al., 1998; Joiner et al., 2003).

Les canaux K^+ de large conductance (Maxi K^+ channels ou BK channels) sont appelés ainsi en raison de leur large conductance (>100 pS) (Castle, 1999). Les canaux BK sont activés par le voltage et le Ca^{2+} intracellulaire (DiChiara et Reinhart, 1997; Ashcroft, 2000). Ils sont souvent associés aux canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L et peuvent limiter la quantité du Ca^{2+} entrant dans la cellule musculaire lisse en agissant comme des inhibiteurs de ces canaux (DiChiara et Reinhart, 1997; Tanaka et al., 2004). Dans les cellules musculaires lisses, le Ca^{2+} libéré via les récepteurs de la ryanodine du réticulum sarcoplasmique augmente la probabilité d'ouverture des canaux BK qui provoquent l'hyperpolarisation de la membrane (Tanaka et al., 2004).

Les canaux K^+ de faible conductance (SK channels) ont une conductance de 4 à 20 pS (Vergara et al., 1998; Castle, 1999). Ce sont des canaux K^+ sélectifs, voltage-indépendants et sont activés par l'augmentation du taux du Ca^{2+} intracellulaire (Castle, 1999; Ashcroft, 2000). Ils sont sensibles à l'apamine. La calmoduline peut être considérée comme la sous-unité β du canal SK. Une fois liée au Ca^{2+} , elle induit un changement de conformation de la sous-unité α qui ouvre le pore du canal (Ashcroft, 2000).

Les canaux K^+ de conductance intermédiaire (IK channels) ont une conductance de 20 à 60 pS (Castle, 1999). Comme les canaux SK, ils sont insensibles au voltage et sont activés par le Ca^{2+} intracellulaire (Castle, 1999; Ashcroft, 2000).

7.1.3.2. Les canaux à deux segments transmembranaires et un pore

La famille des canaux à deux segments transmembranaires est représentée par les canaux à rectification entrante (inward rectifier channels, Kir) et inclue les canaux sensibles à l'ATP (K_{ATP}) (Ho et al., 1993; Jenkinson, 2006). Les canaux Kir sont des canaux voltage-indépendants dont la structure est différente de celle des canaux K_v . Ils sont plus petits que les canaux K_v et organisés en deux segments transmembranaires (Kuriyama et al., 1998; Ashcroft, 2000) (Fig. 10b). Ils sont sujets à la modulation par une variété d'agents cytoplasmiques (les protons, la phosphorylation, les protéines G et les nucléotides à base d'adénine) (Ashcroft, 2000).

Les canaux K^+ qui sont inhibés par l'élévation du taux de l'ATP intracellulaire sont généralement connus sous le nom de canaux K_{ATP} . Ils sont réglés par les nucléotides cytosoliques et sont insensibles aux changements de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (Koh et al., 1998). Plusieurs études ont rapporté la présence des canaux K_{ATP} dans une variété de tissus tels que l'intestin grêle et le côlon (Poggioli et al., 1995; Koh et al., 1998; Flynn et al., 1999). L'ouverture de ces canaux augmente la conductance du K^+ ce qui hyperpolarise la membrane cellulaire, relâche le muscle et réduit l'excitabilité de la membrane (Davies et al., 1996).

7.1.4. Les bloqueurs et les ouvreurs des canaux K^+

Plusieurs substances pharmacologiques sont connues comme des bloqueurs des canaux K^+ des cellules musculaires lisses; ce qui inhibe le courant potassique et favorise la contraction du muscle lisse.

La charybdotoxine (CTX) est assez grande pour passer à travers le pore du canal K_v , mais elle entre dans sa partie externe et occupe le pore (Ashcroft, 2000). De plus, la 4-AP 5 mM bloque les canaux K_v des cellules musculaires lisses circulaires du côlon proximal de cobaye (Vogalis et al., 1998). L'addition du TEA 2 et 20 mM aux cellules musculaires lisses circulaires du côlon distal de lapin réduit respectivement de 49% et 98% le courant potassique à travers les canaux K_{Ca} (Lu et al., 1998). Le TEA (faibles concentrations), la CTX et l'ibériotoxine et mais non l'apamine inhibent les canaux BK (Castle, 1999; Ashcroft, 2000). A l'inverse des canaux BK, les canaux SK sont bloqués par le déqualinium et l'apamine (Castle, 1999; Malik-Hall et al., 2000; Joiner et al., 2003). Plusieurs études ont rapporté que les canaux IK sont insensibles à l'apamine et à l'ibériotoxine mais inhibés par la CTX et le clotrimazole (Castle, 1999; Shieh et al., 2000).

Comme les autres types des canaux K^+ , les canaux K_{ATP} peuvent être bloqués par diverses substances. La glibenclamide et autres dérivés de la sulfonyleurée sont des bloqueurs sélectifs des canaux K_{ATP} des cellules musculaires lisses (Kuriyama et al., 1998). Dans le muscle lisse de la vésicule biliaire, la glibenclamide inhibe le courant potassique induit par le pinacidil à travers les canaux K_{ATP} (Firth et al., 2000). En inhibant les canaux K_{ATP} , la glibenclamide induit une dépolarisation de la membrane du muscle lisse du côlon de souris (Koh et al., 1998).

Les ouvreurs des canaux K^+ comportent un groupe varié de molécules. L'activation des canaux K^+ augmente la conductance du K^+ , hyperpolarise la membrane (réduit l'excitabilité membranaire), diminue la concentration du Ca^{2+} intracellulaire par inhibition de l'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L et relâche le muscle lisse (Becker et al., 2001; Huang et al., 2004).

Il a été rapporté que le NS 004 (Li et al., 1997; Shieh et al., 2000), le NS 1619 (Castle, 1999; Shieh et al., 2000), le NS 1608, le NS 8 (Shieh et al., 2000) et l'acide niflumique (Castle, 1999) sont des ouvreurs des canaux BK. Alors que le 1-éthyl-2-benzimidazoline (1-EBIO) ouvre les canaux IK (Castle, 1999; Shieh et al., 2000).

Dans des études de patch clamp à canal unique, le lemakalim (1 μ M) et le diazoxide (300 μ M) augmentent la probabilité d'ouverture des canaux K_{ATP} des cellules du côlon de la souris et hyperpolarisent la membrane (Koh et al., 1998). De même, dans le muscle lisse circulaire du côlon proximal du cobaye, la cromakalim, un autre ouvreur des canaux K_{ATP} , induit une relaxation remarquable du tissu (Maggi et al., 1996).

7.2. Le couplage excitation-contraction

Les filaments contractiles du muscle lisse de l'intestin regroupent trois types de filaments: les filaments minces d'actine, les filaments épais de myosine et les filaments intermédiaires de desmine (Hansen, 2003a). La contraction musculaire est engendrée par le glissement des filaments d'actine et de myosine les uns par rapport aux autres et nécessite du Ca^{2+} et de l'ATP. L'augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} , sa fixation sur la calmoduline et l'activation de la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) constituent le stimulus primaire de la contraction (Murthy, 2006) (Fig. 11).

Dans le muscle lisse, les agonistes de la contraction ou de la relaxation agissent principalement au moyen des messagers intracellulaires pour induire la libération ou stimuler la séquestration du Ca^{2+} (Hansen, 2003a). La voie de transduction du signal implique l'activation séquentielle d'au moins trois protéines membranaires: un récepteur, une protéine G et la PLC qui est capable de mobiliser le Ca^{2+} intracellulaire. La phosphorylation de la chaîne légère de myosine (MLC_{20}) sur la sérine-19 par la MLCK calcium/calmoduline-dépendante est essentielle pour l'activation de la myosine ATPase et l'interaction actine-myosine (Somlyo et Somlyo, 2003). Par contre, la déphosphorylation de la MLC_{20} par la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP), constituée d'une sous-unité régulatrice (MYPT1) et une sous-unité catalytique (PP1c), induit la relaxation du muscle lisse (Abdel-Latif, 2001; Murthy, 2006).

L'activation d'un récepteur couplé à la protéine G par un agoniste contractile tel que l'ACh initie plusieurs voies de signalisation qui induisent l'influx du Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et les canaux cationiques non sélectifs, active la MLCK et inhibe la MLCP via

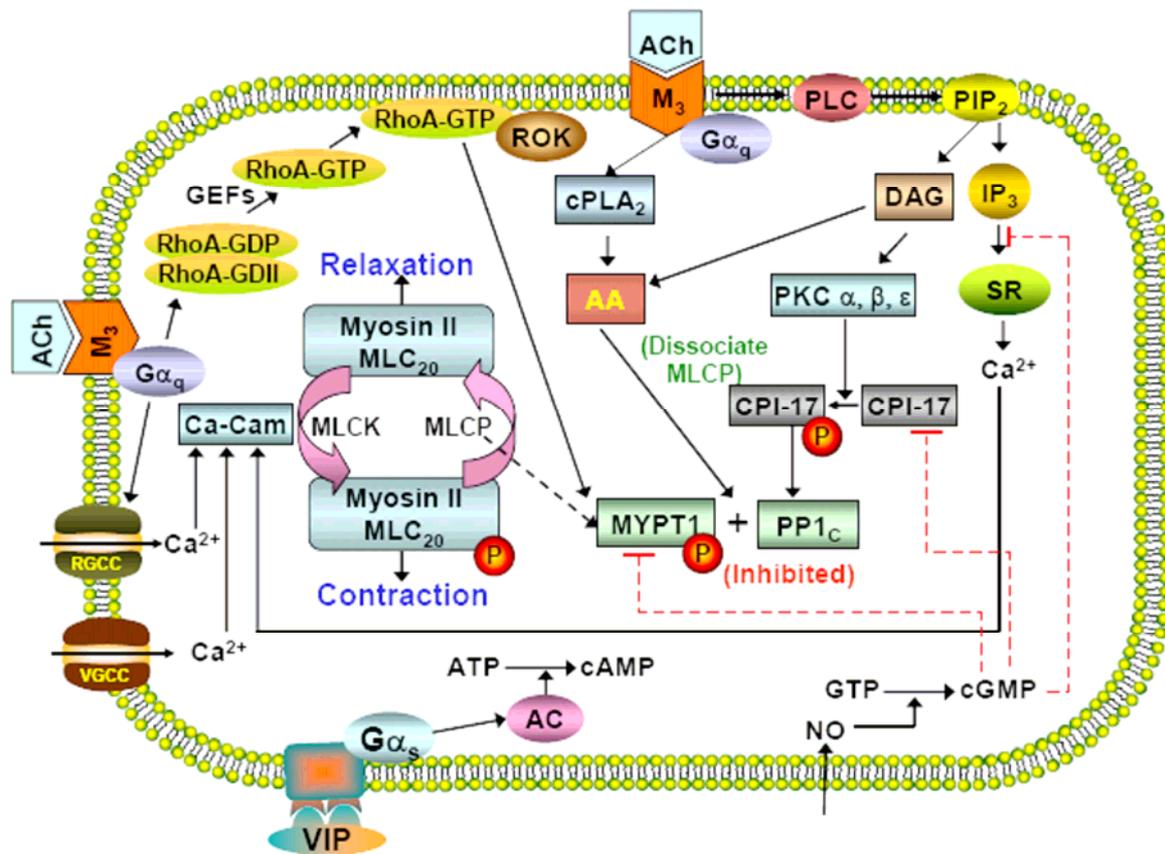


Figure 11. Les voies de la génération de la contraction dans les cellules musculaires lisses circulaires (Sarna, 2006).

AA: acide arachidonique; AC: adényl cyclase; Cam: calmoduline; CPI-17: inhibiteur endogène de la MLCP de 17 KDa; cPLA2: phospholipase A2 cytosolique; DAG: diacylglycérol; GEFs: facteurs d'échange de nucléotide guanylique; MYPT1: sous-unité régulatrice de la MLCP; PIP₂: phosphatidyl inositol 4,5,-biphosphate; PP1c: sous-unité catalytique de la MLCP; RGCC: canaux Ca²⁺ récepteur-dépendants; RhoA-GDI: inhibiteur de dissociation de la guanine; SR: réticulum sarcoplasmique; VGCC: canaux Ca²⁺ voltage dépendants.

la PKC, la Rho kinase (ROK) et la libération de l'acide arachidonique. La liaison de l'ACh à ses récepteurs muscariniques M_3 active la PLC_β qui hydrolyse le PIP_2 de la membrane plasmique en IP_3 et DAG (Murthy et Makhlof, 1997). L' IP_3 se lie à son récepteur localisé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique et induit la libération du Ca^{2+} des réserves sarcoplasmiques (Hansen, 2003a; Sarna, 2006). Ceci est suivi par un influx du Ca^{2+} extracellulaire à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants (Sarna, 1998, 2006). L'élévation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire favorise la formation du complexe calcium/calmoduline qui active la MLCK. Cette dernière phosphoryle la MLC_{20} et initie la contraction du muscle lisse (Hofmann, 2005; Sarna, 2006). En parallèle, le DAG active la PKC (Sarna, 1998; Rattan et al., 2002) qui à son tour phosphoryle plusieurs protéines impliquées dans la transduction du signal et la contraction, et module l'activité de certains types de canaux (Firth et al., 2000; Sarna, 2006). La PKC peut phosphoryler directement la MLC_{20} (Abdel-Latif, 2001) ou indirectement par la phosphorylation du CPI-17, un inhibiteur endogène de la MLCP, sur la thréonine 38, en augmentant sa capacité d'inhiber la MLCP (Murthy, 2006).

Les voies qui conduisent à l'inhibition de la MLCP par les récepteurs couplés à la protéines $G_{q/13}$ sont initiées par l'activation séquentielle des protéines $G\alpha_q/\alpha_{13}$, RhoGEF et RhoA et impliquent la ROK (Murthy, 2006). La protéine G_q activée par un agoniste tel que l'ACh est capable d'activer RhoA. La forme inactive de RhoA (RhoA.GDP) est présente dans le cytosol liée à un inhibiteur de dissociation de la guanine (GDI). L'activation de RhoA par la protéine $G\alpha_q$ et/ou $G\alpha_{13}$ met en jeu les RhoGEFs (Rho-specific guanine nucleotide exchange factors) qui permettent l'échange GDP/GTP. La translocation de RhoA activée (RhoA.GTP) vers la membrane plasmique stimule la ROK (Murthy et al., 2001; Quinn et al., 2006) qui phosphoryle la sous-unité régulatrice MYPT1 sur la thréonine 696 en induisant sa dissociation de la sous-unité catalytique PP1c et l'inhibition de cette dernière, ce qui aboutit à la phosphorylation de la MLC_{20} et la contraction du muscle lisse (Somlyo et Somlyo, 2000; Murthy, 2006).

L'étape finale de l'activation de la voie de signalisation par les neurotransmetteurs excitateurs est la phosphorylation de la MLC_{20} par la MLCK, qui initie la contraction du muscle lisse. Les voies de signalisation stimulées par l'ACh activent la MLCK et inhibent la MLCP pour augmenter la phosphorylation de la MLC_{20} (Somlyo et Somlyo, 2003). L'intensité nette et la durée de la phosphorylation de la MLC_{20} déterminent l'amplitude et la durée de la contraction cellulaire et dépendent de l'intensité relative et du temps des activités de la MLCK et de la MLCP (Sarna, 2006). Les neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le VIP et le NO provoquent la relaxation du muscle lisse circulaire. Le VIP agit sur les récepteurs VPAC2 en activant l'adényl cyclase, ce qui augmente la concentration de l'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Alors que le NO diffuse à travers la membrane pour activer la guanyl cyclase soluble, ce qui augmente la concentration du

GMPc et l'activation de la PKG (Lecci et al., 2002). La PKG inhibe la libération du Ca^{2+} intracellulaire et stimule sa séquestration respectivement par la phosphorylation des récepteurs de l' IP_3 et la pompe Ca^{2+} /ATPase du réticulum sarcoplasmique (Murthy, 2006). Le NO et le VIP diminuent donc la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, inactivent la MLCK et activent la MLCP qui déphosphoryle la MLC_{20} et provoque la relaxation du muscle (Hofmann, 2005; Sarna, 2006).

II. Activité myorelaxante des flavonoïdes

Le terme de flavonoïdes est un nom collectif pour les pigments des plantes. Les flavonoïdes sont des membres d'une classe de composés naturels qui constituent récemment le sujet de plusieurs études à intérêt scientifique et thérapeutique considérable. Ces composés phénoliques sont largement distribués dans les légumes, les fruits, les tiges, les fleurs, le vin et le thé (Benavente-Garcia et al., 1997). Dans lesquelles, ils sont responsables de la couleur, de l'odeur, de l'activité antibactérienne et antifongique dans les diverses parties des plantes vertes (Gee et al., 1998). Les flavonoïdes constituent les polyphénols les plus abondants dans le régime alimentaire avec une moyenne de 200 mg dans le régime occidental quotidien (Scalbert et Williamson, 2000).

1. Structure chimique et classification des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des phénylbenzo-pyrones (phénylchromones) (Middleton et al., 2000). Plus de 6500 flavonoïdes ont été identifiés à partir de sources végétales (Harborne et Williams, 2000). Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires tricycliques ($\text{C}_6\text{-C}_3\text{-C}_6$) où deux cycles benzoïques A et B sont liés par un hétérocycle oxygéné C (Tab. 1). Les chalcones sont caractérisés par l'ouverture de l'hétérocycle oxygéné, alors que dans les aurones, cet hétérocycle ne comprend que deux atomes de carbone (Middleton et al., 2000). Selon la substitution sur le noyau C, l'état d'oxydation de l'hétérocycle, la présence ou l'absence d'une double liaison $\text{C}_2\text{-C}_3$ et la position du noyau B, les flavonoïdes sont divisés en six classes principales: flavanols, flavonols, flavones, flavanones, isoflavones et anthocyanidine (Hodek et al., 2002) (Tab. 1). Les flavones sont constitués de trois cycles, A et C juxtaposés et B lié au cycle C en position 2. Cette classe est caractérisée par la présence de double liaison en $\text{C}_2\text{-C}_3$. Les flavonols contiennent en plus un groupement hydroxyle en position 3. Tandis que, l'anthocyanidine se caractérise par un hétérocycle de type benzopyroxonium à oxygène tétravalent. Dans les isoflavones, le cycle B est lié au cycle C en position 3 (Di Pietro et al., 2002). La substitution de l'un des groupements hydroxyles par un sucre, un groupement méthyle ou un groupement sulfate constitue les flavonoïdes glycosylés, méthylés et sulfatés (Middleton et al., 2000).

2. Activités biologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont doués de plusieurs activités biologiques telles que l'activité anti-inflammatoire (Kim et al., 1998; Vongtau et al., 2000), anti-tumorale (Middleton, 1988; Ikemoto et al., 2000), anti-proliférative (Zhang et al., 2002), antivirale (Middleton, 1988; Di Pietro et al., 2002), anticancéreuse (Liang et al., 1999; Ranelletti et al., 2000), anti-oxydante (Chen et al., 1996; van Acker et al., 1998), antiulcéreuse (Gonzales et al., 2000; La Casa et al., 2000; Lewis et Shaw, 2001), anti-allergique, anti-hypertensive (Villar et al., 2004; Almeida et al., 2006) et myorelaxante (Ajay et al., 2003; Uydes-Dogan et al., 2005).

3. Activité myorelaxante des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances myorelaxantes du muscle lisse de plusieurs tissus (artères, trachée, utérus, estomac et intestin) (Afifi et al., 1999; Ko et al., 2002; Ajay et al., 2003). Les anthocyanines, la catéchine et l'épicatéchine induisent une relaxation qui dépend de la présence de l'endothélium des anneaux aortiques du rat en interagissant avec la synthèse et la libération du NO (Mendes et al., 2003). L'amplitude et la fréquence des contractions spontanées des segments du jéjunum de la souris sont réduites par l'épigallocatechine-3-gallate (Ceregrzyn et Kuwahara, 2003). En outre, l'isoorientine (lutéoline 6-glucoside) induit une diminution de l'amplitude et de la fréquence des contractions phasiques de l'utérus de rat et de cobaye. Par contre ce flavonoïde n'a aucun effet sur l'aorte, l'iléon et la trachée (Afifi et al., 1999).

La flavone et la quercétine (10^{-6} - 10^{-4} M) réduisent le tonus et la contraction phasique de l'iléon de rat de façon qui dépend de la concentration dont les EC_{50} sont respectivement 5.3×10^{-5} et 1.99×10^{-5} M (Hammad et Abdalla, 1997). Selon ces auteurs, la quercétine est plus efficace que la flavone.

Comme les flavonoïdes, les extraits de plantes riches en flavonoïdes relâchent divers types de muscles lisses. En effet, les extraits méthanoliques de *Mentha microphylla*, de *Conyza dioscoridis*, de *Zygophyllum album* et de *Convolvulus arvensis* entraînent une inhibition dose-dépendante (0.4-2.8 mg/ml) de l'activité contractile du muscle lisse du duodénum de lapin (Atta et Mouneir, 2004). En plus, l'extrait brut de *Pavetta crassipes* a été étudié sur des préparations du muscle lisse du jéjunum de lapin, de l'utérus de rat, du tænia coli et de l'iléon du cobaye. Cet extrait entraîne une inhibition concentration-dépendante de l'activité spontanée des tissus (Amos et al., 1998). L'analyse phytochimique des différents extraits révèle la présence des flavonoïdes comme constituants majeurs.

En plus de l'inhibition de la contraction spontanée, plusieurs études montrent que les flavonoïdes purs et les extraits riches en flavonoïdes inhibent la contraction du muscle lisse induite par le KCl, l'ACh ou la phényléphrine (Herrera et al., 1996; Dar et Channa, 1999; Orallo et al.,

2004; Morello et al., 2006). Les flavonols (fisétine, rutine, quercétine, morine, myricétine), les flavones (chrysin, flavone, baicaléine), les flavanones (naringénine, naringine, hespéritine), l'isoflavones (diadzéine, génistéine) et les flavanes (épigallocatechine gallate) produisent une relaxation dose-dépendante des anneaux aortiques du rat précontractés par le KCl 80 mM ou la phényléphrine 0.1 μ M (Herrera et al., 1996; Ajay et al., 2003). De même, la 3-O-méthylquercétine et l'isokampféride (5,7,4'-trihydroxy-3-méthoxyflavone) relâchent le muscle lisse de la trachée du cobaye précontracté par le KCl, l'histamine et le carbachol (Ko et al., 2002; Leal et al., 2006). Le kampférol, la génistéine et la quercétine inhibent aussi la contraction du muscle lisse de l'utérus induite par le KCl 60 mM (Reuelta et al., 1999). La contraction du muscle lisse de la vessie du rat et du porc induite par le carbachol, le KCl et la stimulation par champ électrique est inhibée par la galangine. L'effet de ce flavanol est réduit par le vérapamil, bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L (Capasso et Tavares, 2002; Dambros et al., 2005a).

Comme les composés purs, les extraits des plantes qui contiennent les polyphénols et particulièrement les flavonoïdes inhibent la contraction stimulée. L'ispiduline, flavonoïde extrait de *Clerodendrum petasites* induit une relaxation dose-dépendante du muscle lisse de la trachée du cobaye précontracté par l'histamine avec une EC_{50} de $3.0 \pm 0.8 \mu$ M (Hazekamp et al., 2001). De même, l'extrait de *Bacopa monniera*, qui contient la lutéoline et la lutéoline 7-glycoside, inhibe non seulement la contraction spontanée de l'iléon de cobaye et du jéjunum de lapin mais aussi la contraction induite par l'ACh 1 μ M de façon qui dépend de la concentration (Dar et Channa, 1999).

Les flavonoïdes inhibent donc la contraction spontanée et induite du muscle lisse dont l'effet myorelaxant est attribué à plusieurs mécanismes: la modification de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la contraction, l'altération de la mobilisation du Ca^{2+} , l'interférence avec la voie nitreurgique et les canaux K^+ .

3.1. Effets des flavonoïdes sur les enzymes impliquées dans les voies de la signalisation intracellulaire

Les flavonoïdes peuvent modifier l'activité de certaines enzymes impliquées dans les voies de la signalisation intracellulaire. Plusieurs études ont rapporté que les flavonoïdes inhibent la PKC, une enzyme qui phosphoryle diverses protéines de la transduction du signal et de la contraction du muscle lisse (Herrera et al., 1996; Agullo et al., 1997). Seulement les flavones (lutéoline et diosmétique) et les flavonols (quercétine, myricétine et kampférol) 60 μ M inhibent l'activité de la PKC extraite du cerveau des bovins (Agullo et al., 1997). De même, la morine, la myricétine, la chrysin, la naringénine, l'hespéritine et la génistéine inhibent la contraction tonique des anneaux aortiques de rat induite par le phorbol 12-myristate-13-acétate, activateur de la PKC (Herrera et al., 1996). Par contre, la quercétine n'a aucun effet sur la contraction induite par le 1,2-dioctanoylglycérol 10^{-7} M, agoniste de la PKC (Sohn et al., 2001). Dans une étude effectuée sur le

muscle lisse circulaire de l'œsophage de chat, Sohn et ses collaborateurs (2001) ont utilisé la quercétine comme inhibiteur de la MLCK, une enzyme qui phosphoryle la MLC_{20} et qui stimule la contraction du muscle. Ce flavonoïde inhibe, de façon dépendante de la concentration, la contraction du muscle induite par l'ACh 10^{-10} M.

Les tyrosines kinases sont impliquées en tant qu'éléments de la transduction du signal des agonistes de la contraction du muscle lisse (Hollenberg, 1994; Akbarali et al., 2000). Plusieurs études ont utilisé la génistéine (isoflavone) comme inhibiteur de la tyrosine kinase du muscle lisse de l'utérus de rat (Ausina et al., 1996), des anneaux de l'aorte du rat (Duarte et al., 1997), de la vésicule biliaire du cobaye (Alcon et al., 2000), du côlon du rat (Takeuchi et al., 1999; Mulè et al., 2002) et du duodénum du lapin (Grasa et al., 2006).

Le Rp-cAMPS (Rp-adenosine 3', 5'-cyclic monophosphothioate, triéthylamine salt) et le TPCK (N-p-tosyll-phenylalanine-chloromethyl-ketone), inhibiteurs de la PKA, antagonisent l'effet myorelaxant de la quercétine, du kampférol et de la génistéine (Revuelta et al., 1997, 2000). Par contre, l'inhibition de la phosphodiesterase par la papavérine augmente l'effet myorelaxant du kampférol, ce qui explique que l'inhibition de la dégradation de l'AMPc augmente l'effet de ce flavonoïde (Revuelta et al., 2000). Ce résultat est confirmé par le fait que la 3-O-méthylquercétine, flavonoïde extraite de *Rhamnus nakaharai*, inhibe de manière dépendante de la concentration l'activité des phosphodiesterases de la trachée du cobaye (Ko et al., 2002). De même, l'inhibition de l'adényl cyclase par la 2'-3'-didéoxyadénosine antagonise l'effet myorelaxant du kampférol exercé sur le muscle lisse de l'utérus du rat (Revuelta et al., 2000) bien que la relaxation du muscle lisse de l'aorte induite par la galangine n'est pas modifiée par l'inhibition de cette enzyme par le SQ 22,536 (Morello et al., 2006).

La delphinidine-3-rutinoside est l'anthocyanine majeure de *Ribes nigrum L*, elle induit la relaxation du muscle lisse ciliaire des bovins par diminution du taux de phosphorylation de la MLC_{20} (Matsumoto et al., 2005). Au niveau des anneaux de l'aorte de rat, la flavone inhibe de façon qui dépend de la concentration la contraction et la phosphorylation de la MLC_{20} induites par le U46619, un analogue de la thromboxane A2. En plus, ce flavonoïde inhibe la phosphorylation de la sous-unité régulatrice MYPT1 de la MLCP induite par le U46619 via la kinase ROCK (Rho/Rho-associated kinase) (Jeon et al., 2007). En plus de ces enzymes, les flavonoïdes sont connus comme des inhibiteurs de la cyclooxygénase, de la lipooxygénase (Liang et al., 1999; Hong et al., 2001) et de la phosphatidylinositol 3-kinase α (Agullo et al., 1997; Yoshizumi et al., 2001).

3.2. Effets des flavonoïdes sur la mobilisation du Ca^{2+}

Plusieurs études montrent que l'activité myorelaxante des flavonoïdes est attribuée d'une part à leurs effets sur la mobilisation du Ca^{2+} . Dans l'iléon du cobaye, la flavone 3,3'-di-O-méthylquercétine déplace la courbe concentration-réponse du $CaCl_2$ vers la droite et inhibe la

contraction induite par l'histamine en présence de l'EGTA, un chélateur du Ca^{2+} , ce qui montre que ce flavonoïde inhibe l'entrée du Ca^{2+} et sa libération à partir des réserves intracellulaires (Abdalla et al., 1989). A concentration élevée, la galangine diminue la contraction du muscle lisse induite par le carbachol en présence du Ca^{2+} aussi bien que celle induite par le carbachol et la caféine en absence du Ca^{2+} extracellulaire, suggérant que ce flavonoïde inhibe la contraction par inhibition de l'influx du Ca^{2+} et la modulation du mouvement du Ca^{2+} intracellulaire. L'effet myorelaxant de ce flavonoïde est plus important sur la contraction induite par la caféine que sur celle induite par le carbachol, suggérant que la galangine a un effet important sur la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, qui peut être attribué à son effet sur les récepteurs ryanodine (Dambros et al., 2005a,b). Par ailleurs, la galangine abolit l'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire induite par le KCl et la phényléphrine dans les cellules musculaires lisses de l'aorte du rat en présence et en absence de Ca^{2+} externe (Morello et al., 2006). Le flavoxate (piperidinoéthyl-3-méthylflavone-8-carboxylate hydrochlorure) réduit, d'une manière dépendante de la concentration, la contraction du muscle détrusor induite par le KCl par inhibition des canaux Ca^{2+} de type L (Tomoda et al., 2005).

L'effet des flavonoïdes sur la libération du Ca^{2+} intracellulaire a été examiné indirectement par l'étude de la réponse de l'aorte du rat à la phényléphrine et à la noradrénaline dans une solution dépourvue de Ca^{2+} et en présence de certains flavonoïdes (Ajay et al., 2003; Roghani et al., 2005). Dans ces conditions, la fisétine et la flavone suppriment la contraction transitoire induite par la phényléphrine. Ceci explique que l'action vasorelaxante des flavonoïdes contre la contraction induite par la phényléphrine implique l'inhibition de la libération du Ca^{2+} des réserves sarcoplasmiques (Ajay et al., 2003).

L'extrait de *Bacopa monniera* inhibe l'influx du Ca^{2+} via les canaux voltage-dépendants, ce qui inhibe l'activité spontanée du muscle lisse de l'iléon de cobaye et du jéjunum de lapin (Dar et Channa, 1999). Par ailleurs, l'effet relaxant de l'extrait des feuilles de *Pavetta crassipes* est complètement bloqué en présence de la vérapamil, bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L, suggérant l'implication de l'inhibition de l'influx du Ca^{2+} et/ou l'inhibition de sa libération des réserves du réticulum sarcoplasmique dans la relaxation du muscle lisse du jéjunum de lapin (Amos et al., 1998).

3.3. Effets des flavonoïdes sur la voie nitreurgique

En plus de l'altération de l'homéostasie du Ca^{2+} par les flavonoïdes, l'interférence de ces composés avec la voie nitreurgique peut constituer un autre mécanisme impliqué dans la relaxation du muscle lisse. La quercétine induit une relaxation concentration-dépendante des anneaux aortiques de rat précontractés par la noradrénaline (Roghani et al., 2005). Cette réponse est diminuée après le prétraitement avec le L-NAME, inhibiteur de la NOS, indiquant que la quercétine

induit une vasodilatation partiellement dépendante de NO. De même, l'effet myorelaxant d'autres flavonoïdes (flavone, quercétine, naringénine, fisétine et diadzéine) implique en partie la libération du NO de l'endothélium du fait que le prétraitement des anneaux aortiques avec le L-NAME diminue la réponse à la phényléphrine (Ajay et al., 2003).

La delphinidine-3-rutinoside extrait de *Ribes nigrum L.* exerce un effet inhibiteur sur la contraction induite par l'endothéline et augmente la production du GMPc (Matsumoto et al., 2005). En outre, la vasodilatation induite par la diocléine, flavonoïde extrait de *Dioclea grandiflora* est abolie après l'enlèvement de l'endothélium et le traitement avec le L-NAME. Ceci indique que la réponse des vaisseaux précontractés par la phényléphrine à ce flavonoïde est dépendante du NO. En plus, la diocléine induit une augmentation du taux de GMPc (Lemos et al., 1999). Leal et ses collaborateurs (2006) ont montré qu'en plus de l'inhibition de la NOS par le L-NAME, l'inhibition de la guanyl cyclase soluble par l'ODQ 33 μ M inhibe partiellement la relaxation du muscle lisse de la trachée induite par l'isokampféride (5,7,4'-trihydroxy-3-methoxyflavone) d'*Amburana cearensis*. Selon ces auteurs, la relaxation induite par l'isokampféride fait intervenir l'activation de la voie de NO/guanyl cyclase/GMPc.

3.4. Effets des flavonoïdes sur les canaux K^+

Il est connu que l'accumulation de GMPc peut activer l'expression de la PKG de type I qui stimule la sortie de K^+ via ses canaux et induit la relaxation du muscle lisse (Leal et al., 2006). Donc l'ouverture des canaux K^+ par les flavonoïdes peut donc constituer un autre mécanisme de la relaxation du muscle lisse.

La naringénine, un flavanone, induit une relaxation dépendante de la concentration des anneaux de l'aorte précontractés par le KCl et la noradrénaline (Saponara et al., 2006). Le TEA, l'ibériotoxine et la 4-AP antagonisent l'effet vasorelaxant de ce flavonoïde, alors que la glibenclamide, bloqueur des canaux K_{ATP} , n'a aucun effet, indiquant que la vasorelaxation induite par la naringénine est due à l'activation des canaux BK_{Ca} et non les canaux K_{ATP} . A l'inverse de la naringénine, la glibenclamide inhibe la vasorelaxation de la lutéoline et de la 5-hydroxyflavone, ce qui explique l'implication des canaux K_{ATP} dans le mécanisme d'action de ces flavonoïdes (Calderone et al., 2004). De même, l'extrait aqueux riche en flavonoïdes d'*Aspalathus linearis* induit la relaxation du muscle lisse du jéjunum de lapin. Cette réponse est diminuée en présence de la glibenclamide, ce qui indique que l'effet myorelaxant de l'extrait est dû à l'activation des canaux K_{ATP} . Chaque constituant de cet extrait (chrysoeriol, orientine, vitéxine) montre un effet similaire à l'extrait aqueux, tandis que la rutine exerce un effet identique à celui du blocage des canaux Ca^{2+} par le vérapamil (Gilani et al., 2006). Dans le muscle lisse de la trachée contracté par le KCl 40 mM, la préincubation avec la glibenclamide ou l'ibériotoxine inhibe la relaxation induite par l'isokampféride. En effet, l'ibériotoxine induit un déplacement à droite de la courbe concentration-

réponse de ce flavonoïde. Alors que, la 4-AP, antagoniste non sélectif des canaux K^+ , n'influence pas l'effet de l'isokampféride (Leal et al., 2006). L'activité myorelaxante de l'hespérétine, de la lutéoline, de la 5-hydroxyflavone et de la 7-hydroxyflavone est bloquée par le TEA, indiquant la possibilité de la participation des canaux K_{Ca} dans la relaxation. En plus, l'ibériotoxine inhibe l'effet de la 5-hydroxyflavone, ce qui montre l'importance du groupement hydroxyle en position 5 pour l'interaction possible avec les canaux BK_{Ca} (Calderone et al., 2004).

Etude Expérimentale

I. Matériel et Méthodes

1. Les animaux d'expérience

Des lapins des deux sexes d'un poids corporel moyen de 1060 ± 339 g (moyenne \pm SD), fournis par des fermiers locaux, sont utilisés dans les expériences. Les animaux sont directement utilisés sans période de jeûne et disposent de l'eau à volonté.

Les lapins sont sacrifiés par exsanguination au niveau de la carotide. Après laparotomie ventromédiane, le côlon entier est rapidement excisé et lavé avec la solution physiologique (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). Le tissu est ensuite débarrassé du mésentère puis divisé en trois parties égales et placées dans le milieu physiologique aéré jusqu'à leur utilisation. Ces parties sont considérées représenter le côlon proximal, moyen et distal (Fig. 12) qui vont servir à la mesure de leur activité mécanique.

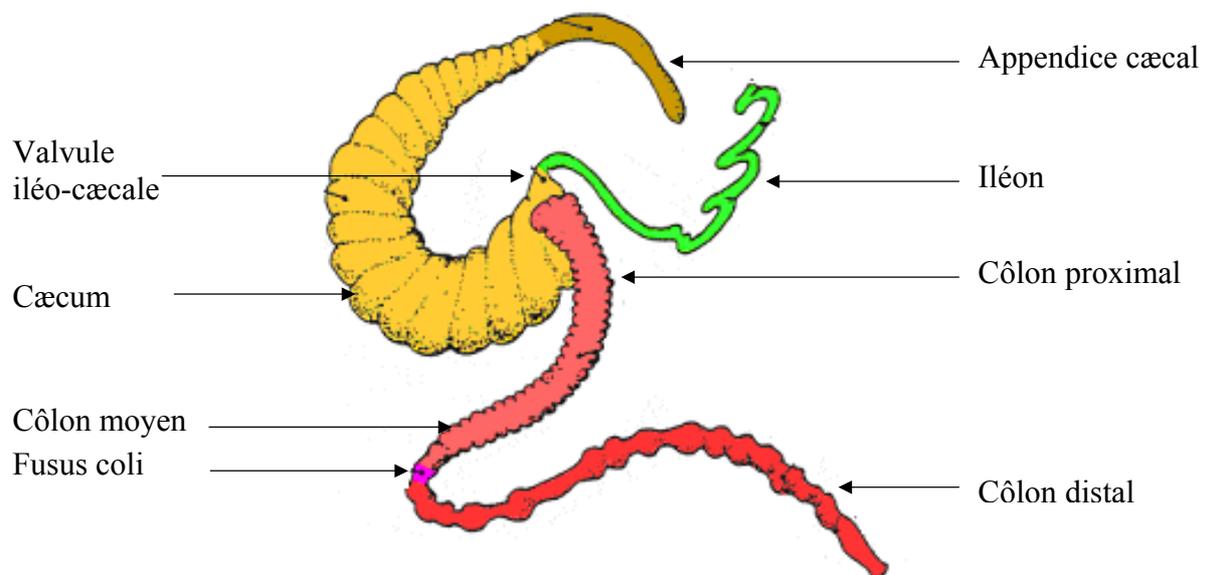


Figure 12. Schéma de l'anatomie du côlon de lapin (d'après Lebas et al., 1996).

2. Le dispositif de mesure de la contraction musculaire

Le dispositif de mesure de la contraction du muscle lisse comprend un transducteur de force, un amplificateur et une carte d'acquisition et de numérisation des données. Les transducteurs de force isométrique (TRI 201/25 g, Letica, Barcelone, Espagne) ou isométrique-isotonique (FSG-01/3, Experimetria, Budapest, Hongrie) sont reliés à des amplificateurs de signaux (QUAD Bridge, ADInstruments, Castle Hill, Australie; EXP-D, Experimetria, Budapest, Hongrie), chacun étant relié à une carte de conversion analogique/digitale (Powerlab/8sp, ADInstruments, Castle Hill, Australie; DI 700-PGL USB, DATAQ Instruments, Ohio, USA) gérée par son logiciel correspondant (Chart V4.2, Powerlab, ADInstruments, Castle Hill, Australie; WinDaqLite V2.31,

DATAQ Instruments, Ohio, USA). Le logiciel permet de calibrer les transducteurs et d'enregistrer l'activité mécanique; celle-ci est réalisée à 2 Hz.

L'activité mécanique est enregistrée sur des bandelettes de muscle lisse circulaire du côlon. Pour cela, un fragment de tissu est fixé à plat sur un bloc de cire dentaire à l'aide d'aiguilles entomologiques puis excisé le long de la ligne mésentérique. Des bandelettes d'environ 2x10 mm sont coupées dans la direction perpendiculaire à l'axe longitudinal puis placées dans une chambre à organe contenant selon le cas 5 ou 25 ml de solution physiologique aérée en continu (37°C) (Fig. 13). L'une des extrémités de la bandelette est fixée au fond de la chambre grâce à un crochet, l'autre extrémité est reliée par un fil au transducteur de force préalablement calibré (1 ou 5 g).

Après la mise en place des préparations musculaires dans la chambre à organe, le tissu est soumis à une force initiale de 1 g en ajustant son étirement grâce à un micro-positionneur solidaire du transducteur. En général, quatre fragments sont testés simultanément: trois sont traités avec les substances tests et le quatrième avec les différents solvants (eau distillée, DMSO, NaOH 0.5 N) pour servir comme témoin. Les bandelettes sont laissées se stabiliser pendant 45 minutes avec un renouvellement du milieu physiologique toutes les 15 minutes. Dans le but de vérifier la viabilité du tissu, les préparations musculaires sont stimulées par le carbachol (1 ou 10 μM) après la période de stabilisation et pendant une période qui ne dépasse pas 3 minutes. Après élimination du carbachol par lavage, une deuxième période d'équilibration de 45 minutes est effectuée dont les dernières 15 minutes serviront comme période de référence et dénommée, dans la suite du texte, période basale.

3. Protocoles expérimentaux

3.1. Effets des agonistes et des antagonistes cholinergiques sur l'activité mécanique

La réponse du côlon (proximal, moyen et distal) au carbachol est étudiée à différentes concentrations allant de 10^{-9} à 10^{-4} M (25 μl correspondant à 0.1% du volume total). Le temps de contact est de 3 minutes pour obtenir une contraction maximale. Les additions successives sont effectuées toutes les 15 minutes (période basale) après le renouvellement du milieu d'incubation. La tension maximale de la contraction induite par chaque concentration de carbachol est comparée avec celle du tonus de repos de la période basale.

Dans une autre série d'expériences, les préparations musculaires du côlon moyen sont incubées en présence de différents modulateurs de la transmission cholinergique.

La néostigmine, inhibiteur réversible de l'acétylcholine estérase (Drago et al., 2002) est ajoutée au milieu d'incubation à des concentrations cumulées (0.03–10 μM) (Gharzouli et Holzer, 2004).

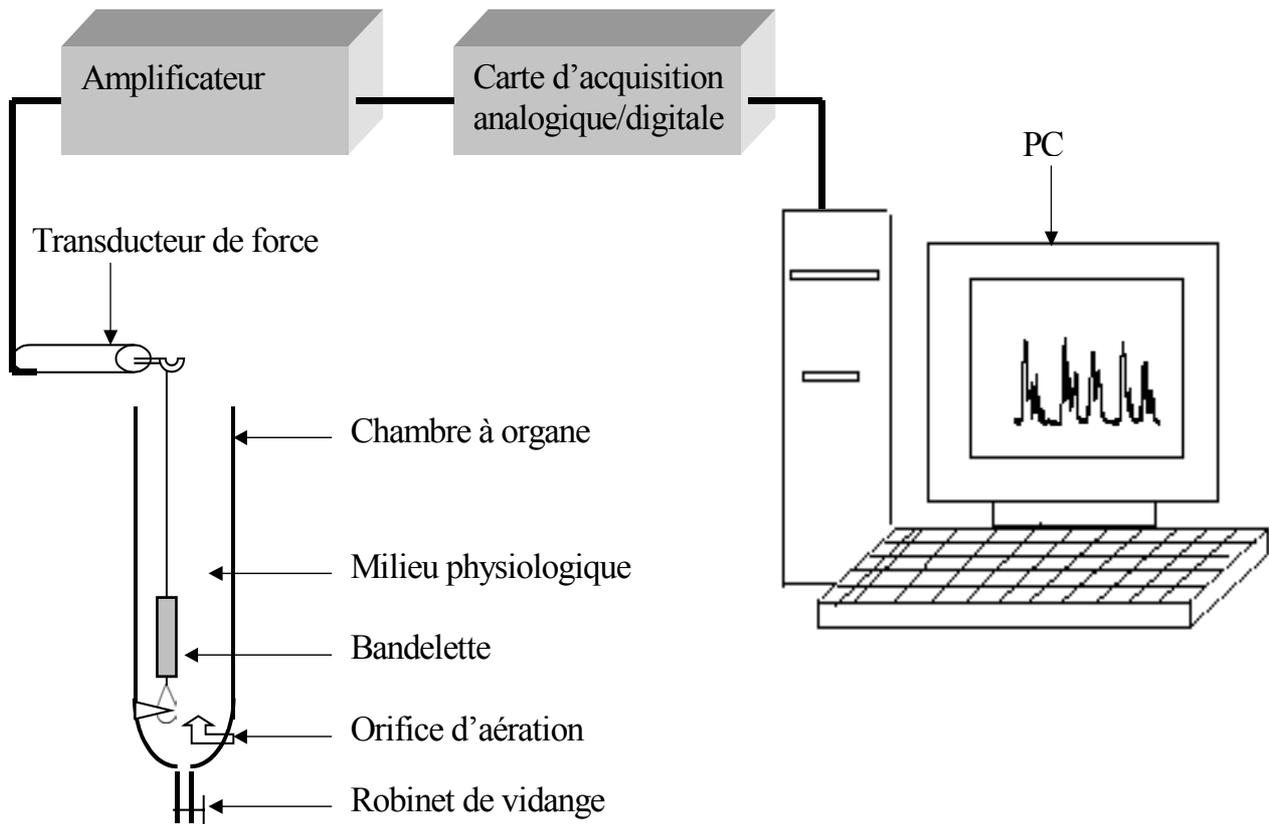


Figure 13. Schéma du dispositif d'enregistrement de la contraction des bandelettes du muscle lisse du côlon.

Le volume global additionné (87.5 μ l) représente 0.4% du volume total. Le temps de contact de chaque concentration avec le tissu est de 15 minutes, durée nécessaire pour observer une réponse stable.

Après la période d'équilibration, des bandelettes du côlon moyen sont incubées pendant 15 minutes avec l'atropine 1 μ M, antagoniste muscarinique (Carl et al., 1995), l'hexaméthonium 100 μ M, antagoniste nicotinique (Hosseini et al., 1999) ou le DMPP 5 μ M, agoniste nicotinique (Percy et al., 2001). Le volume ajouté au milieu d'incubation est de 25 μ l de chaque solution (0.1% du volume total).

3.2. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée

L'effet du TEA, un bloqueur non sélectif des canaux K^+ (Carl et al., 1995; Dong et al., 2005), du déqualinium, un bloqueur des canaux K^+ sensibles à l'apamine (Castle, 1999) et du diazoxide, un ouvreur des canaux K_{ATP} (Buharalioglu et Akar, 2002) est étudié sur des bandelettes du côlon moyen et à différentes concentrations.

Après équilibration, les préparations musculaires sont incubées pendant 15 minutes avec le TEA 5 mM ou le déqualinium 10 μ M à raison de 25 μ l (0.1% du volume total). Le même protocole est utilisé avec le diazoxide mais à des concentrations cumulées allant de 10 à 100 μ M (0.2% du volume total).

3.3. Rôle de la voie nitreurgique sur la contraction spontanée

L'effet du L-NAME, inhibiteur de la NOS (Holzer et al., 1997), et de la L-arginine, le substrat de cette enzyme (Okamura et al., 1998), sur l'activité contractile spontanée est étudié sur les préparations musculaires du côlon moyen. Le tissu est incubé avec du L-NAME 100 μ M (25 μ l) pendant 15 minutes ou de la L-arginine 4 mM (250 μ l) pendant 45 minutes.

Une autre série d'expériences est réalisée pour étudier l'effet du SNP, donneur de NO (Alcon et al., 2001a), et du bleu de méthylène, inhibiteur de la guanyl cyclase (Börjesson et al., 1999) sur la contraction spontanée du côlon. Les bandelettes sont incubées en présence de concentrations cumulées de SNP (0.1 – 100 μ M) ou de bleu de méthylène (10 – 100 μ M). Le volume global ajouté au milieu d'incubation n'excède pas 0.5% dans les deux cas. Chaque concentration est laissée au contact du tissu pendant 15 minutes avant d'ajouter la suivante.

3.4. Effets de l'orthovanadate sur l'activité mécanique

L'effet du sodium orthovanadate, inhibiteur de la phosphotyrosine phosphatase (Alcon et al., 2000) sur l'activité mécanique du côlon moyen est étudié à des concentrations cumulées. Chaque concentration de sodium orthovanadate 30 – 1000 μ M (0.3% du volume total) est laissée au contact du tissu pendant 20 minutes.

3.5. Effets de la quercétine et de la flavone sur l'activité mécanique spontanée

A des fins de comparaison, l'effet de la quercétine et de la flavone sur la contraction spontanée est étudié sur des bandelettes des trois régions du côlon.

A la fin de la période d'équilibration, la quercétine en solution dans la NaOH 0.5 N, la flavone en solution dans le DMSO ou les véhicules sont ajoutés de façon cumulée aux concentrations finales allant de 1 à 100 μM au milieu d'incubation. Le volume global des solutions tests et des véhicules ajouté aux chambres d'incubation représente 0.4% du volume total. Chaque concentration est laissée au contact du tissu pendant 15 minutes.

A la fin des additions, les bandelettes sont lavées, laissées se stabiliser pendant 15 minutes et subissent une dernière stimulation par le carbachol 1 μM pour vérifier l'effet des deux flavonoïdes sur la contraction induite par le carbachol.

3.6. Effets de la quercétine et de la flavone sur la contraction induite par le carbachol et le KCl

Après la période d'équilibration, la contraction des bandelettes du côlon moyen est stimulée pendant une minute avec le carbachol 10 μM ou le KCl 80 mM pour vérifier la viabilité du tissu. Les volumes ajoutés aux chambres sont respectivement 20 μl (0.4%) de carbachol et 100 μl (2%) de KCl 4 M. Les préparations musculaires sont ensuite lavées et subissent une seconde stimulation avec le même agent après le retour à l'activité basale. Un plateau est observé respectivement après 15 et 30 minutes de contact avec le carbachol et le KCl. Au plateau de la contraction, les bandelettes sont traitées avec la quercétine, la flavone ou les véhicules de façon cumulée à des concentrations finales allant de 1 à 100 μM , chacune pendant 15 minutes. Le volume ajouté au milieu d'incubation représente 1.3% (65.3 μl) du milieu total de la chambre. Les préparations musculaires sont ensuite lavées. Après le retour à l'activité basale, les bandelettes sont stimulées avec le carbachol ou le KCl pour tester la réversibilité des effets des flavonoïdes.

3.7. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+

A la fin de la période d'incubation avec le TEA 5 mM ou le déqualinium 10 μM , la quercétine et la flavone 1 et 30 μM sont successivement ajoutées, respectivement pendant 5 et 30 minutes. Les tissus servant comme témoins sont traités avec les véhicules de la même manière.

Après les additions cumulées du diazoxide jusqu'à 100 μM , les bandelettes sont traitées avec l'un de ces deux flavonoïdes 1 μM (5 minutes) et 30 μM (30 minutes). Le volume de solution ajouté représente 0.2% du volume total.

3.8. Effets de la flavone sur l'activité mécanique spontanée en présence du L-NAME et du SNP

Après 15 minutes d'incubation avec le L-NAME ou le SNP 100 μM , les bandelettes du côlon moyen sont traitées avec la flavone 30 μM ou le DMSO (25 μl correspondant à 0.1% du volume total). Le temps de contact du tissu avec le flavonoïde est de 30 minutes.

3.9. Effets de la flavone avant et après stimulation de l'activité mécanique spontanée par diverses substances

Les préparations musculaires du côlon moyen sont pré-incubées avec la néostigmine 10 μM , le bleu de méthylène 100 μM ou le sodium orthovanadate 1 mM pendant 15 minutes. Après cette durée, la flavone 30 et 100 μM ou le véhicule (0.2% du volume total) sont ajoutés aux bandelettes de façon cumulée pendant 15 minutes pour chaque concentration.

Afin d'étudier l'effet de la flavone sur la réponse à la stimulation par différentes substances, les bandelettes sont pré-incubées avec le flavonoïde 30 μM (15 minutes) puis traitées avec le TEA 5 mM, le déqualinium 10 μM ou le bleu de méthylène 100 μM . Chaque substance est laissée au contact du tissu pendant 15 minutes.

4. Evaluation de la contraction du muscle lisse circulaire du côlon

Les bandelettes circulaires du muscle lisse du côlon de lapin génèrent deux types de contraction, des contractions phasiques et des CGs.

L'évaluation des contractions phasiques nécessite la mesure de l'amplitude (différence entre la moyenne des tensions maximales et la moyenne des tensions minimales) et de la fréquence des contractions. Elle est effectuée sur les trois dernières minutes d'enregistrement de chaque période d'incubation (Fig. 14a).

La caractérisation des CGs des bandelettes traitées ou non traitées exige la mesure de plusieurs paramètres pendant les trois dernières minutes ou pendant les cinq premières et cinq dernières minutes (pour le TEA) de chaque période d'incubation. Les différents paramètres évalués sont le tonus de repos, la tension maximale des contractions, l'amplitude (différence entre la tension maximale des contractions et le tonus de repos), la fréquence et la durée des CGs (Fig. 14b).

L'estimation du tonus de repos, de la tension maximale, de la moyenne des tensions maximales et celle des tensions minimales ainsi que la fréquence des contractions phasiques est effectuée à l'aide de procédures implantées dans le programme Chart (ADInstruments). En parallèle, l'amplitude, la fréquence et la durée des CGs sont calculées manuellement.

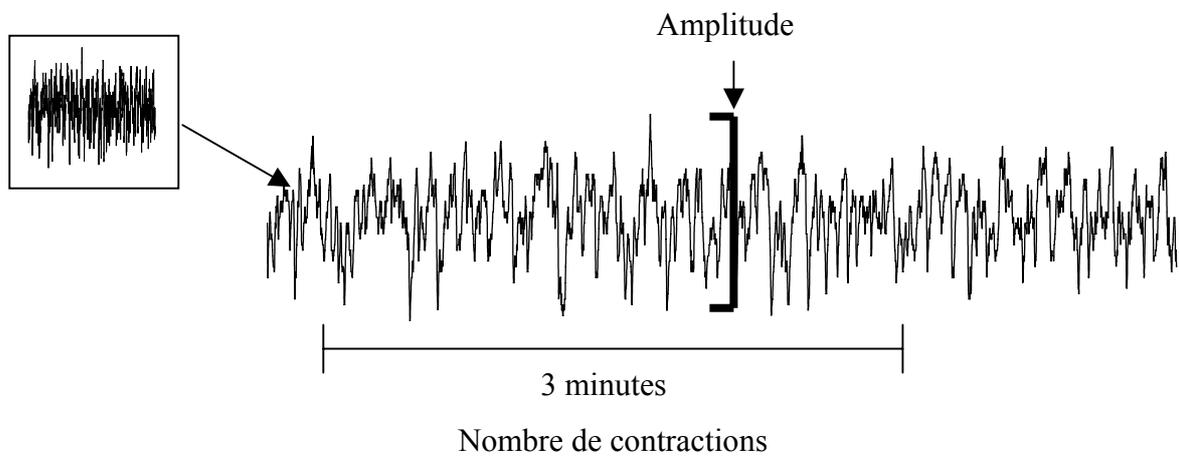
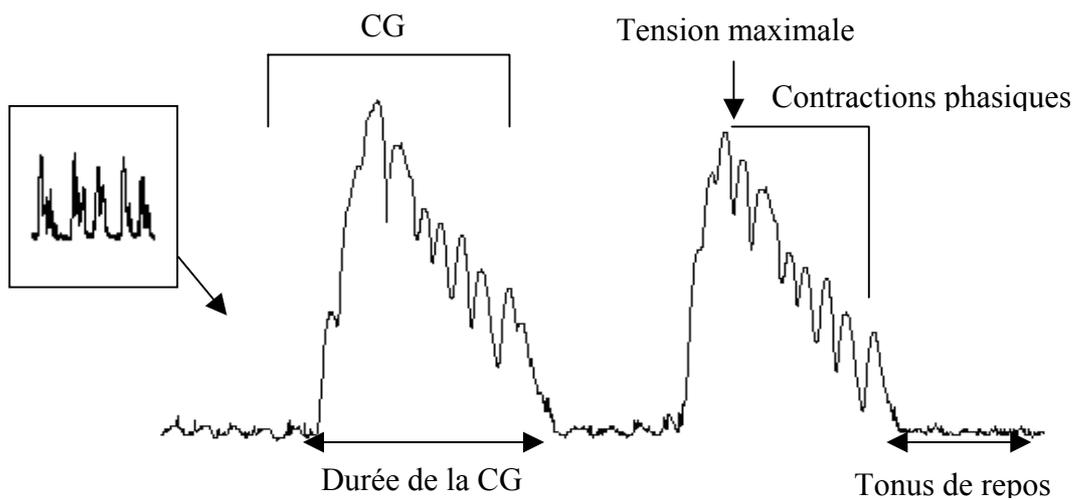
a) Contractions phasiques**b) Contractions géantes**

Figure 14. Schéma illustrant les paramètres utilisés pour l'évaluation des contractions phasiques (a) et des CGs (b) des bandelettes circulaires.

L'étude de l'effet de différentes substances utilisées est effectuée en comparant la réponse par rapport à la période basale. La réponse du tissu aux flavonoïdes est exprimée en pourcentage par rapport à la contraction maximale induite par le KCl ou le carbachol. L'effet des flavonoïdes en présence de différentes substances est comparé avec celui de ces substances. Par contre, l'effet de ces substances en présence de la flavone est comparé avec le véhicule (DMSO).

5. Produits chimiques et solutions

Tous les produits chimiques utilisés sont de qualité analytique (Fluka, AG-Buchs, Suisse et Sigma, St-Louis, USA).

Le milieu physiologique est composé de NaCl 126 mM, KCl 6 mM, MgCl₂ 1.2 mM, CaCl₂ 2 mM, EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) 0.01 mM, HEPES (acide N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[4-butanesulfonique] 10.5 mM, et glucose 14 mM (Kwon et al., 2000). Il est préparé par le mélange de deux solutions stocks A et B et l'addition du glucose 14 mM. La solution A concentrée 10 fois contient tous les sels sauf le HEPES. La solution de HEPES (solution B: 52.5 mM) concentrée 20 fois est ajustée à pH 7.4 avec la NaOH 1 N (pH-mètre Orion EA 940, Boston, USA).

Une solution stock de carbachol 100 mM (carbamylcholine chlorure, Sigma) est préparée dans l'eau distillée et répartie en aliquots conservés au congélateur. Les dilutions de la solution stock sont réalisées avec le milieu physiologique pour obtenir la solution de travail.

Des solutions stocks de 50 ou 100 mM de quercétine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone dihydrate, Sigma) et de flavone (2-phényl-4-H-1-benzopyran-4-one, Sigma) sont fraîchement préparées et conservées à l'abri de la lumière. La quercétine est préparée dans la NaOH 0.5 ou 1 N et la flavone dans le DMSO pur. Les dilutions de la quercétine sont faites avec de l'eau distillée et celles de la flavone avec le DMSO. La quercétine est conservée à 4°C et la flavone à température ambiante.

L'atropine 1 mM (atropine sulfate, Sigma), l'hexaméthonium 100 mM (Sigma), le DMPP 5 mM (1,1-diméthyl-4-phényl-pipérazine iodure, Sigma), le TEA 500 mM (tétraéthylammonium chlorure, Sigma), le L-NAME 100 mM (N ω -nitro-L-arginine méthylester HCl, Sigma), le SNP 100 mM (nitroprussiate de sodium, Sigma) et la L-Arginine 400 mM (Fluka,) sont fraîchement préparés dans de l'eau distillée et conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Le bleu de méthylène 100 mM (Sigma), la néostigmine 100 mM (néostigmine bromure, Sigma) et le sodium orthovanadate 1 M (Na₃VO₄, Sigma) sont préparés dans l'eau distillée. Le déqualinium 10 mM (déqualinium chlorure, Sigma) est fraîchement préparé dans le DMSO et conservé à température ambiante. Le diazoxide 100 mM (Sigma) est préparé sous forme de solution stock congelée et conservée à l'abri de la lumière.

6- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. Le test de Student pour valeurs appariées est appliqué 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 ou l'analyse de variance suivie par le test de Dunnett pour les comparaisons avec le contrôle ou le test de Tukey pour les comparaisons multiples. Le risque d'erreur α est fixé à 5%.

La EC_{50} représente la concentration du carbachol exigée pour obtenir 50% de son effet maximal. La EC_{50} du carbachol est déterminée par la régression non linéaire selon le modèle sigmoïde dose-réponse:

$$y = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + 10^{\frac{\log C_{50} - x}{-x}}}$$

où x représente le log de la concentration molaire; E_{\min} , la réponse minimale; E_{\max} , la réponse maximale et C_{50} , la EC_{50} .

II. Résultats expérimentaux

1. L'activité contractile spontanée

Les bandelettes circulaires des trois régions du côlon de lapin se caractérisent par une activité contractile sous deux formes différentes ayant l'aspect soit de contractions phasiques soit de CGs (Fig. 15).

Certaines bandelettes circulaires du côlon (35%) génèrent des contractions phasiques caractérisées par des oscillations d'amplitude irrégulière et non rythmique. Cette activité est sans différence notable entre les trois régions du côlon. La comparaison entre les trois régions du côlon pour la tension maximale, la moyenne des tensions minimales et la fréquence des contractions ne montre aucune différence significative ($P > 0.05$). Les résultats regroupés provenant de 7 animaux se présentent comme suit: la tension maximale: 1.07 ± 0.05 g; la tension minimale: 0.84 ± 0.04 g; la fréquence des oscillations: 14.7 ± 0.54 contractions par minute (cpm).

L'activité régulière et rythmique, appelée CGs, est observée dans 65% des bandelettes testées. L'observation préliminaire des enregistrements révèle que la stimulation des préparations musculaires par le carbachol au début de chaque expérience participe à la régularité et la rythmicité de cette activité. Une CG peut être décrite par une phase initiale de développement de la tension maximale suivie d'une phase de relaxation. Les CGs se distinguent des contractions phasiques par une phase de repos, nommée tonus de repos, séparant deux CGs successives. Le tonus de repos (0.64 ± 0.04 g) se caractérise par des oscillations de très faible amplitude.

Dans le côlon proximal, la tension maximale est de 1.45 ± 0.05 g, correspondant à une amplitude développée de 0.82 ± 0.05 g ($n=16$). Chaque CG dure 53.8 ± 4.5 secondes (1.11 ± 0.08 cpm) et présente dans sa phase de relaxation 13.2 ± 1.4 contractions phasiques ($n = 16$).

Les bandelettes du côlon moyen génèrent une tension maximale de 1.42 ± 0.04 g, correspondant à une amplitude de 0.77 ± 0.04 g ($n = 19$). La durée de chaque CG est de 56.2 ± 5.72 secondes (1.07 ± 0.07 cpm) et le nombre d'oscillations au sein de la CG est de 13.5 ± 1.32 ($n = 19$).

Les préparations musculaires du côlon distal se caractérisent par une tension maximale de 1.36 ± 0.07 g, correspondant à une amplitude développée de 0.73 ± 0.07 g ($n = 17$). Chaque CG dure 51.9 ± 4.3 secondes (1.08 ± 0.06 cpm) et présente dans sa phase de relaxation 13.3 ± 1.10 contractions phasiques ($n = 17$).

La comparaison des paramètres caractéristiques des CGs (tension maximale, durée et fréquence des CGs et nombre de contractions phasiques par CG) ne révèle aucune différence significative ($P > 0.05$). Par conséquent, la suite des expériences a été réalisée sur des bandelettes du côlon moyen.

Le nombre élevé ($n = 68$) d'animaux d'expérience ayant servi à la préparation des bandelettes circulaires du côlon moyen a permis d'apprécier d'avantage les paramètres de leur activité

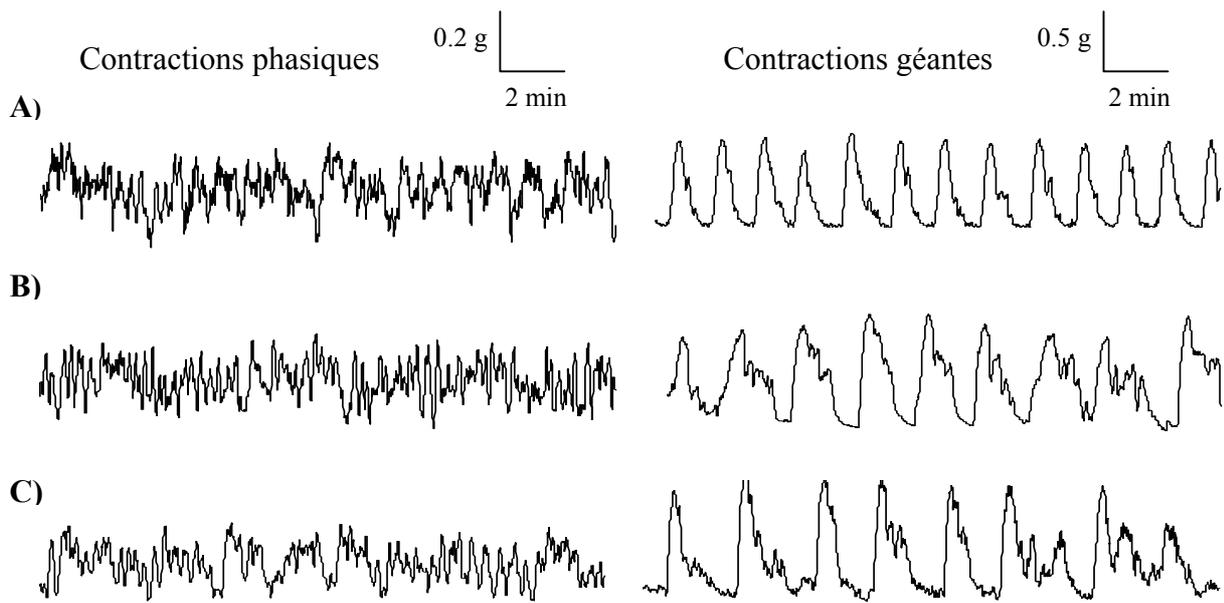


Figure 15. Enregistrements typiques des contractions phasiques et des CGs des bandelettes circulaires du côlon proximal (A), moyen (B) et distal (C). La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

contractile spontanée. Sur un nombre total de 391 bandelettes, 256 ont présenté des CGs (65.4%) et 135 ont présenté des contractions phasiques (34.5%), le taux d'incidence est identique si les calculs étaient effectués sur la base du nombre d'animaux et non des bandelettes.

Les contractions phasiques avec une fréquence de 16.5 ± 0.82 cpm ($n = 48$) oscillent entre 0.85 ± 0.02 g (tension minimale) et 0.99 ± 0.02 g (tension maximale) ($n = 48$).

L'amplitude développée par les CGs est de 0.79 ± 0.02 g ($n = 59$) surajoutée sur un tonus de repos de 0.67 ± 0.02 g ($n = 59$). L'analyse de la fréquence de distribution de la durée et de la fréquence des CGs ainsi que le nombre de contractions phasiques dans la phase de relaxation sont résumés dans le tableau 2.

La durée des CGs est de 64.1 ± 2.50 secondes; plus de la moitié des bandelettes présentent des CGs avec une durée allant de 50 à 90 secondes (62.7% des cas) correspondant à une fréquence allant de 0.70 à 1.10 cpm (67.8% des cas). Le nombre moyen de contractions phasiques au sein de la CG est de 16.1 ± 0.75 .

Tableau 2. La fréquence de distribution de la durée, de la fréquence des CGs et du nombre de contractions phasiques par CG.

Durée de la CG (seconde)	Proportion d'animaux (%)	Fréquence des CGs (CGs/minute)	Proportion d'animaux (%)	Nombre de contractions phasiques par CG	Proportion d'animaux (%)
< 30	1.69	[0.5 – 0.7[10.2	5 – 12	22.0
31 – 50	27.1	[0.7 – 1.1[67.8	13 – 16	35.6
51 – 90	62.7	[1.1 – 1.3[11.9	17 – 20	22.0
91 – 110	5.08	[1.3 – 1.9[10.2	21 – 37	20.3
111 – 117	3.39				

2. Effets des agonistes et des antagonistes cholinergiques sur l'activité mécanique du côlon

La stimulation des récepteurs cholinergiques par le carbachol induit une contraction biphasique du muscle lisse circulaire: une contraction phasique (pic de contraction) suivie par une contraction tonique qui reste stable pendant au moins 90 minutes (temps de contact du tissu avec le carbachol) (Fig. 16).

La contraction phasique induite par l'application du carbachol (10^{-9} - 10^{-4} M) pendant trois minutes aux bandelettes circulaires des trois régions du côlon dépend de la concentration (Fig. 17). La contraction phasique devient significative à partir de 10^{-7} M ($P \leq 0.05$) et atteint le maximum avec la concentration 10^{-5} M (côlon proximal: 2.58 ± 0.17 g; côlon moyen: 2.31 ± 0.09 g; côlon

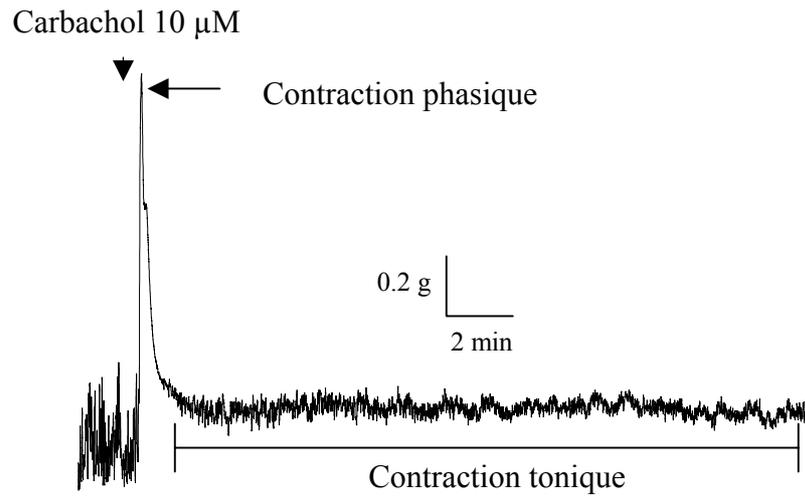


Figure 16. Enregistrement typique de la contraction induite par le carbachol au niveau des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

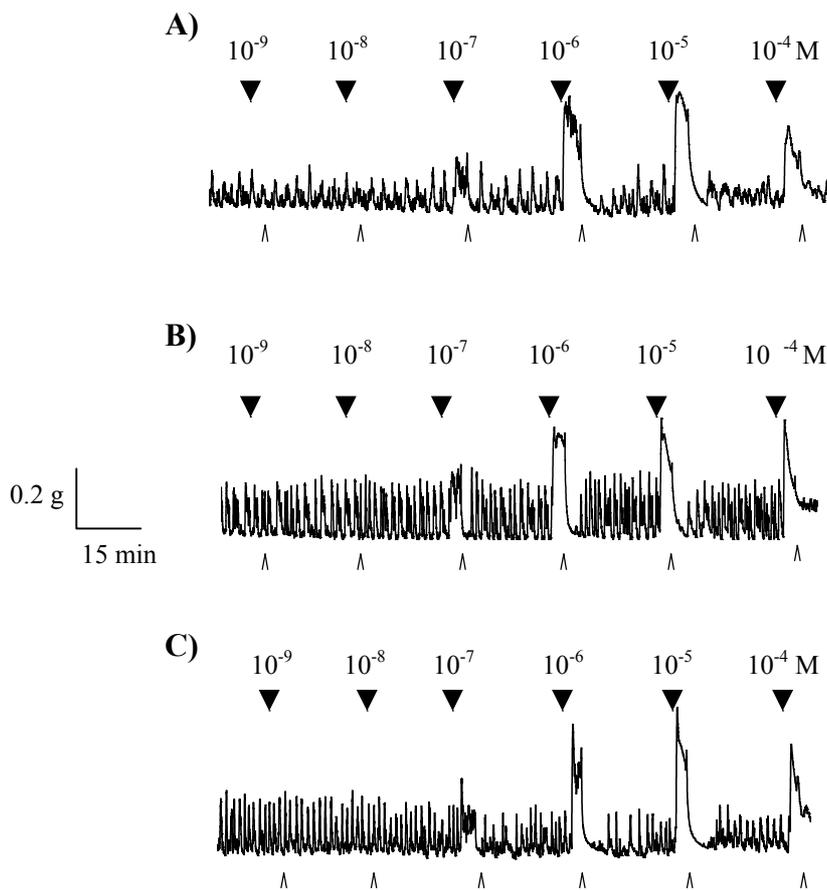


Figure 17. Enregistrements typiques de l'effet du carbachol sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon proximal (A), moyen (B) et distal (C). La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz. Λ : Lavage

distal: 2.14 ± 0.13 g; $n = 6$; Fig. 18). Les paramètres de l'ajustement de l'ensemble des données selon le modèle sigmoïde dose-réponse sont résumés dans le tableau 3.

La comparaison des EC_{50} des trois régions du côlon ne montre aucune différence significative. Par contre, la réponse maximale (E_{max}) des bandelettes du côlon proximal est différente de celle du côlon moyen et distal ($P \leq 0.05$). Bien qu'il n'existe pas de différence entre la région moyenne et distale, l'inspection des E_{max} révèle l'existence d'un gradient décroissant proximal-distal.

Tableau 3. Paramètres de l'ajustement de la contraction phasique selon le modèle sigmoïde dose-réponse.

Côlon	E_{max} (g)	pD_2	EC_{50} (M)
Proximal	2.53 ± 0.09 [2.36 – 2.71]	6.77 ± 0.20 [7.17 – 6.37]	$1.69 \cdot 10^{-7}$ [$6.77 \cdot 10^{-8}$ – $4.23 \cdot 10^{-7}$]
Moyen	$2.21 \pm 0.07^*$ [2.07 – 2.36]	6.61 ± 0.20 [7.01 – 6.21]	$2.43 \cdot 10^{-7}$ [$9.66 \cdot 10^{-8}$ – $6.11 \cdot 10^{-7}$]
Distal	$2.04 \pm 0.07^*$ [1.90 – 2.19]	6.78 ± 0.22 [7.22 – 6.33]	$1.68 \cdot 10^{-7}$ [$6.02 \cdot 10^{-8}$ – $4.67 \cdot 10^{-7}$]

pD_2 : - logarithme la concentration de l'agoniste qui induit 50% de la réponse maximale. Les valeurs entre crochets représentent l'intervalle de confiance avec une probabilité de 95%. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n=36$), *: $P \leq 0.05$ par rapport au côlon proximal pour le paramètre correspondant.

A partir de la concentration $1 \mu M$, la néostigmine convertit les CGs en contractions phasiques dont le tonus de repos et l'amplitude dépendent de la concentration (Fig. 19). En présence de faibles concentrations (0.03 et $0.3 \mu M$) de néostigmine, les CGs sont toujours observées mais seule l'amplitude est nettement élevée (Fig. 20). Lorsque la concentration de néostigmine est augmentée à 1 et $10 \mu M$, le tonus de repos est significativement augmenté et reste stable avec la plus forte concentration (basal: 0.65 ± 0.04 g, $n= 5$; néostigmine $10 \mu M$: 1.66 ± 0.2 g; $n=5$; $P \leq 0.05$; Fig. 20). La perte de l'activité rythmique et l'augmentation du tonus de repos sont des indicateurs de la conversion affective des CGs en contractions phasiques dont la fréquence est significativement diminuée par rapport aux animaux témoins (Fig. 20).

Pour vérifier le rôle des récepteurs muscariniques dans la contraction spontanée du muscle lisse circulaire, l'atropine $1 \mu M$ est ajoutée aux bandelettes pendant 15 minutes. L'atropine $1 \mu M$ n'affecte pas le type de la contraction spontanée (CGs) des bandelettes circulaires du côlon moyen (Fig. 21). Les différents paramètres qui caractérisent les CGs ne sont pas modifiés suite à l'application de l'atropine sauf que le tonus de repos est légèrement diminué ($P \leq 0.05$, Tab. 4).

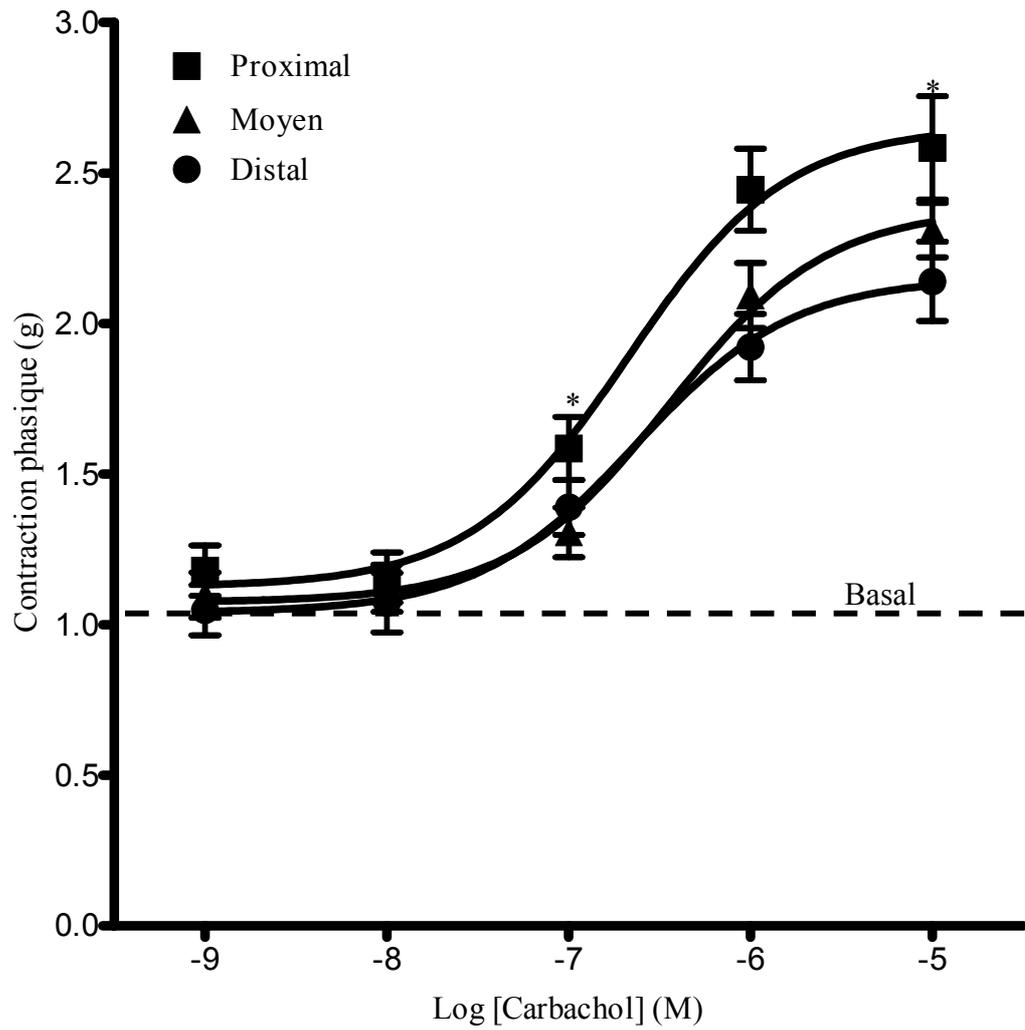


Figure 18. Courbe dose-réponse de l'effet de l'addition non cumulée du carbachol aux bandelettes du côlon proximal, moyen et distal. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 6$). *: La comparaison est effectuée par rapport à la période basale.

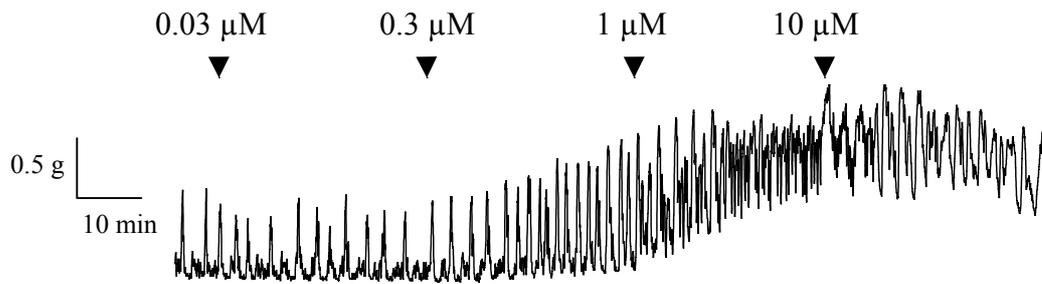


Figure 19. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée de la néostigmine sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

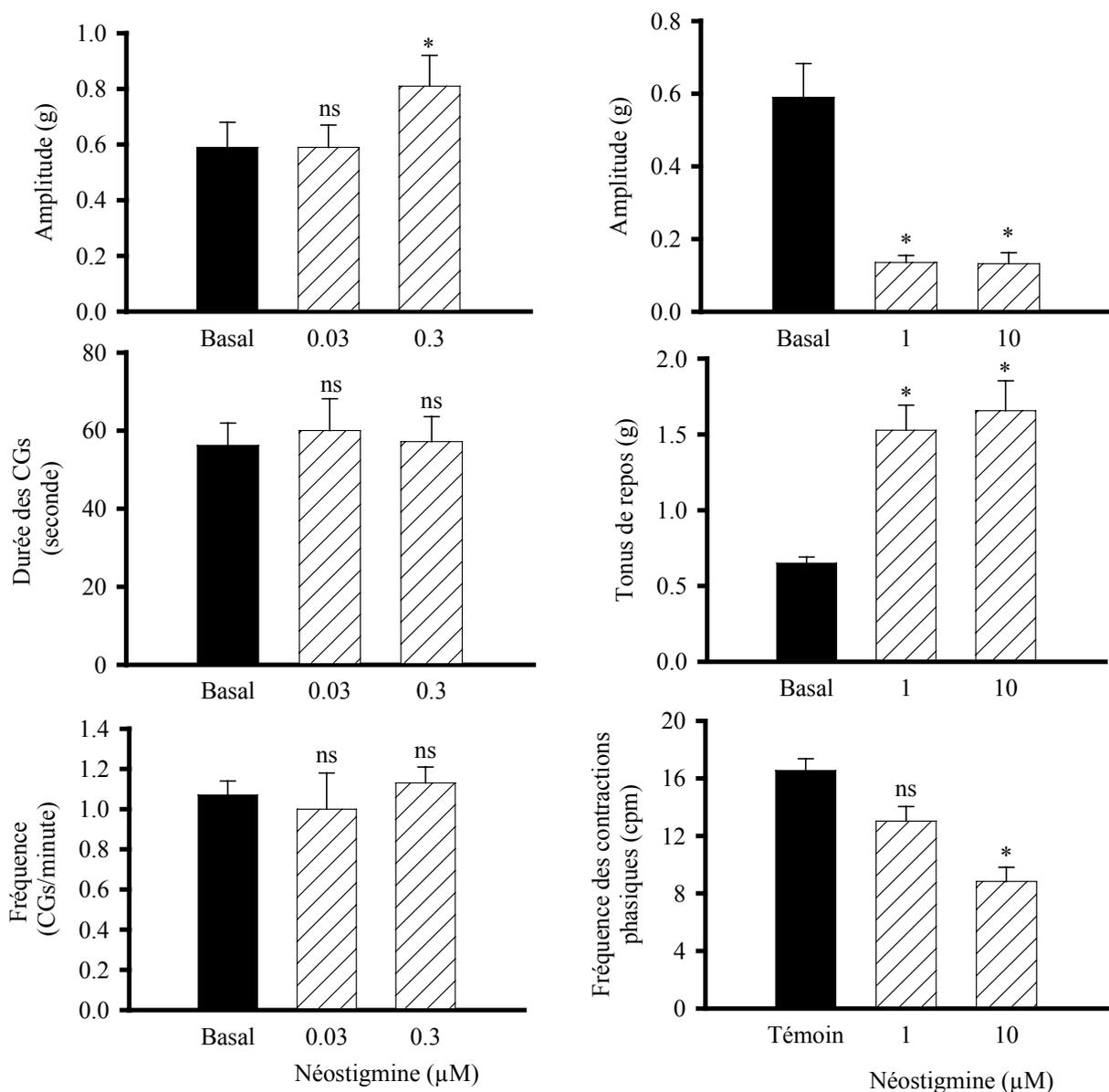


Figure 20. Effet de l'addition cumulée de la néostigmine sur l'amplitude, la fréquence et la durée des CGs, le tonus de repos et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (basal et néostigmine: n = 5; témoin: n = 48). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale ou par rapport au témoin (animaux témoins). *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

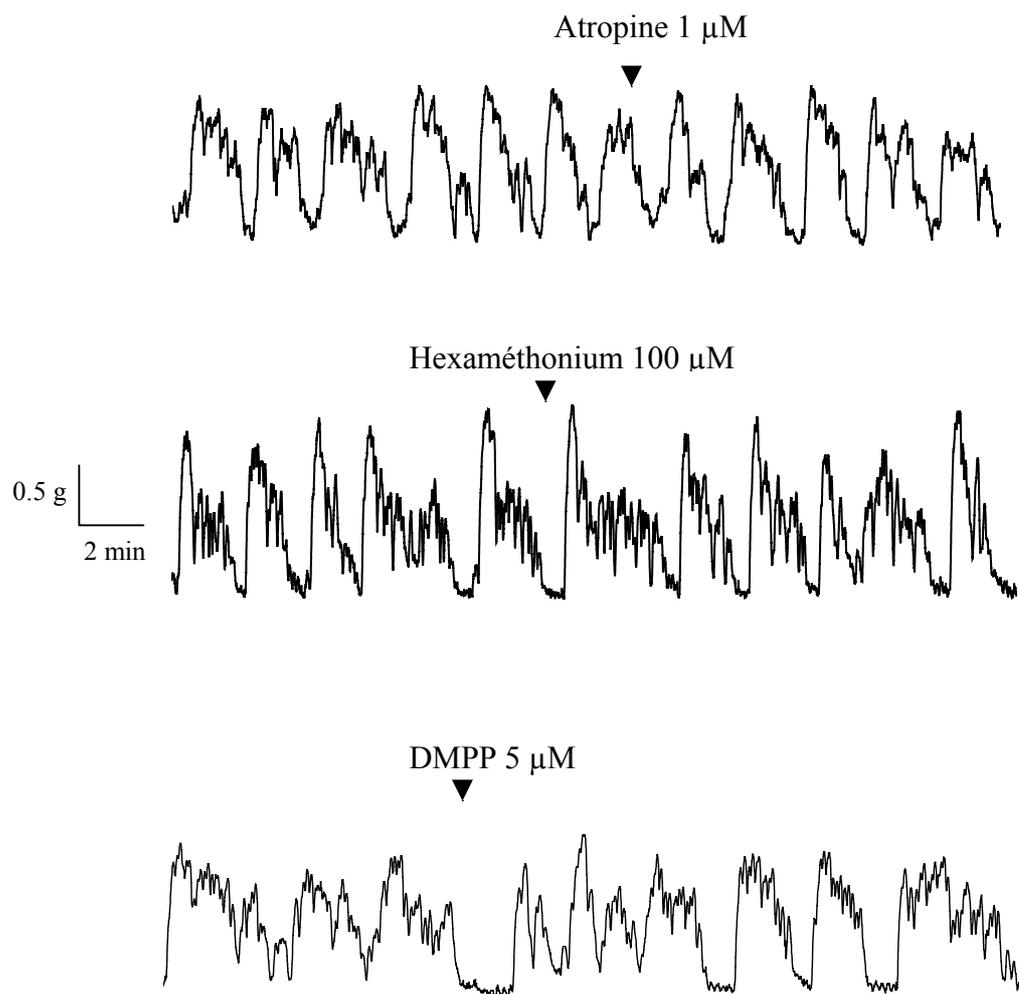


Figure 21. Enregistrements typiques de l'effet de l'atropine, de l'hexaméthonium et du DMPP sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 4 Hz.

Afin de vérifier le rôle des récepteurs nicotiques dans la contraction spontanée du muscle lisse circulaire, l'hexaméthonium 100 μM est incubée avec les bandelettes pendant 15 minutes. L'hexaméthonium 100 μM n'affecte pas le type de la contraction spontanée (CGs) des bandelettes circulaires du côlon moyen (Fig. 21). Les différents paramètres qui caractérisent les CGs ne sont pas modifiés suite à l'application de l'hexaméthonium sauf que la tension maximale des contractions est légèrement augmentée ($P \leq 0.05$, Tab. 4).

Le DMPP 5 μM (agoniste des récepteurs nicotiques) entraîne une relaxation des bandelettes circulaires du côlon moyen pendant les premières minutes (148 ± 41 s, $n=8$) de son application (Fig. 21). Cet effet est observé dans 15 cas sur 19, ce qui indique que c'est un effet généralisé. La tension développée pendant cette période (0.73 ± 0.06 g; $n = 8$) n'est pas significativement différente de celle du tonus de repos de la période basale ou après 15 minutes d'incubation en présence de DMPP. Passée les premières minutes, les CGs reprennent normalement sans être affectées sauf dans leur tension et tonus de repos qui diminuent significativement ($P \leq 0.05$; Tab. 4).

Tableau 4. Le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs des bandelettes du côlon moyen à l'état basal et sous l'effet de l'atropine 1 μM , de l'hexaméthonium 100 μM et du DMPP 5 μM .

Traitement	Tonus de repos (g)	Tension maximale (g)	Fréquence (CGs/minute)	Durée des CGs (seconde)
Basal	0.85 ± 0.06	1.57 ± 0.05	0.80 ± 0.03	81.86 ± 3.63
Atropine	$0.76 \pm 0.04^*$	$1.52 \pm 0.07\text{ns}$	$0.82 \pm 0.05\text{ns}$	$76.95 \pm 6.13\text{ns}$
Basal	0.77 ± 0.05	1.61 ± 0.04	1.61 ± 0.04	68.59 ± 3.27
Hexaméthonium	$0.81 \pm 0.07\text{ns}$	$1.70 \pm 0.05^*$	$1.70 \pm 0.05\text{ns}$	$66.38 \pm 4.57\text{ns}$
Basal	0.88 ± 0.06	1.55 ± 0.06	0.90 ± 0.07	72.98 ± 6.36
DMPP	$0.69 \pm 0.04^*$	$1.38 \pm 0.08^*$	$0.90 \pm 0.06\text{ns}$	$59.24 \pm 4.45\text{ns}$

Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 8, 9$). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale, *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

3. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée

Pour étudier le rôle des canaux K^+ dans la génération des CGs, des bloqueurs (TEA et déqualinium) et un ouvreur (diazoxide) de ces canaux sont appliqués à des bandelettes circulaires du côlon moyen.

3.1. Effet du TEA

Le TEA 5 mM modifie l'allure de l'activité spontanée. Dans certains cas, les CGs sont converties en contractions phasiques (taux d'incidence: 13 bandelettes/21 bandelettes provenant de 7 animaux; Fig. 22a). Dans d'autres cas, les CGs sont maintenues mais leur allure change au cours du temps d'incubation (taux d'incidence: 8 bandelettes/21 bandelettes provenant de 7 animaux) (Fig. 22b).

Dans le cas où le TEA induit des contractions phasiques, le tonus de repos augmente significativement de 0.72 ± 0.05 g à 1.26 ± 0.06 g, $n = 13$; ($P \leq 0.05$) et l'amplitude des contractions diminue de 0.94 ± 0.04 g à 0.17 ± 0.02 g, $n = 13$, ($P \leq 0.05$) (Fig. 23). La fréquence des contractions n'est pas modifiée (animaux témoins: 16.5 ± 0.82 cpm, $n = 48$; TEA 5 mM: 15.1 ± 0.04 cpm, $n = 13$, $P > 0.05$; Fig. 23).

Dans le cas où les CGs sont maintenues, le profil général des contractions est modifié pendant au moins les cinq premières minutes et retourne progressivement à l'activité basale. La fréquence des CGs passe de 0.79 ± 0.05 à 3.56 ± 0.26 ($n = 7$, $P \leq 0.05$) puis à 0.97 ± 0.12 cpm ($n = 7$) vers la fin de l'incubation (Fig. 23). La durée des CGs diminue très fortement dans la valeur par rapport à la période basale (8.82 ± 0.54 secondes, $n = 7$, $P \leq 0.05$) et s'allonge vers la fin (53.9 ± 4.40 secondes, $n = 7$, $P \leq 0.05$) (Fig. 23). Alors que la tension des contractions diminue durant la première phase puis augmente significativement après 15 minutes d'incubation.

3.2. Effet du déqualinium

L'application du déqualinium 10 μ M aux bandelettes convertit progressivement les CGs en contractions phasiques (Fig. 24). L'amplitude des contractions phasiques est significativement réduite par rapport à celle enregistrée pendant la période basale (basal: 0.83 ± 0.09 g; déqualinium 10 μ M: 0.12 ± 0.03 g, $n = 9$, $P \leq 0.05$; Fig. 25). La fréquence des contractions n'est pas modifiée (animaux témoins: 16.5 ± 0.82 cpm, $n = 48$; déqualinium 10 μ M: 16.7 ± 0.90 , $n = 9$, $P > 0.05$; Fig. 25).

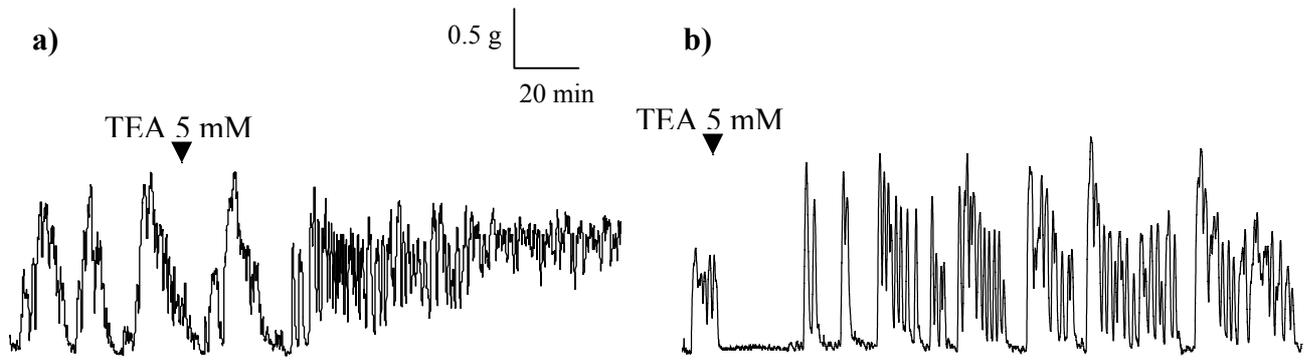


Figure 22. Enregistrements typiques de l'effet du TEA 5 mM sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

a) Contractions toniques. b) CGs.

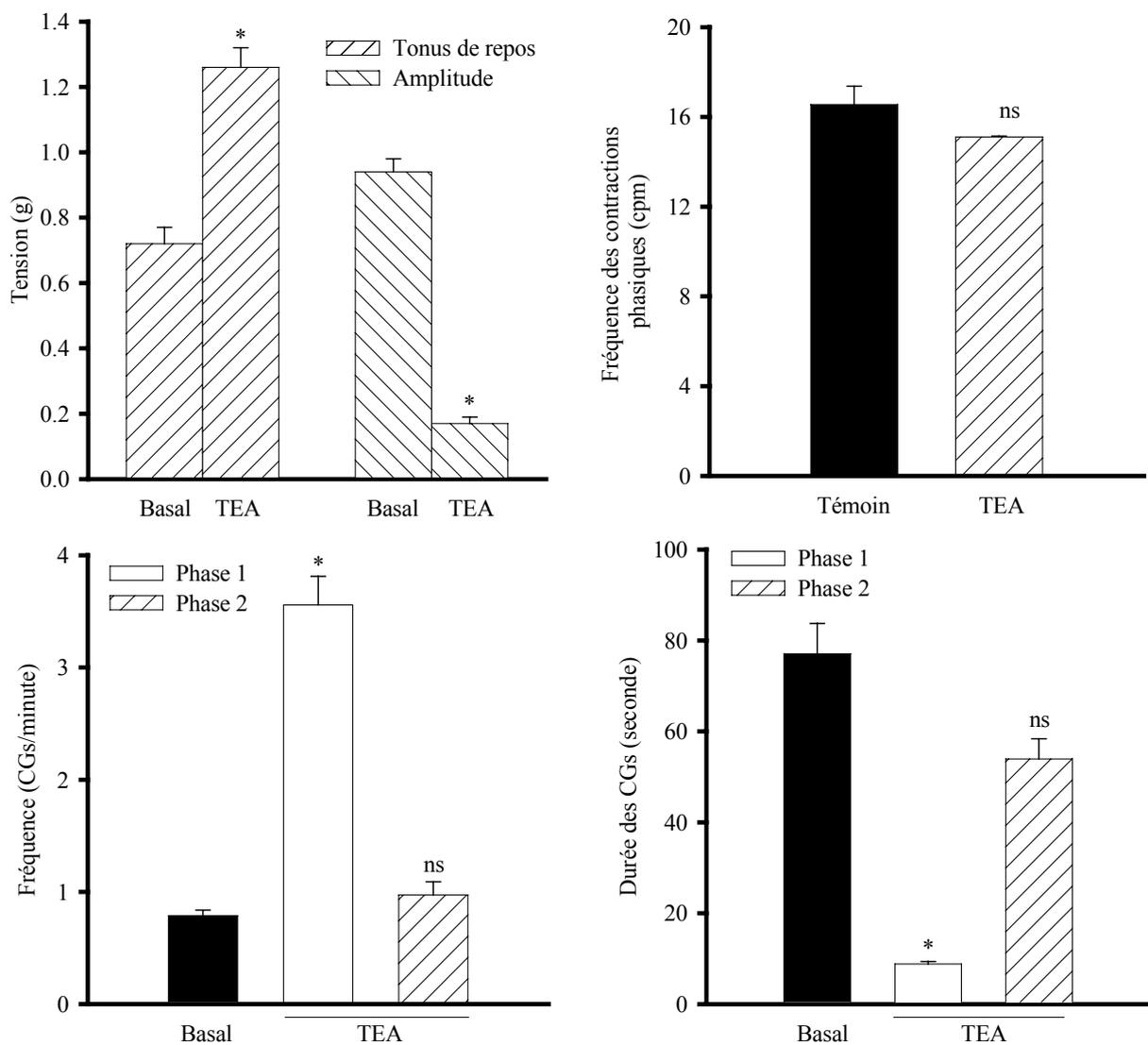


Figure 23. Le tonus de repos, l'amplitude, la fréquence des contractions phasiques, la fréquence et la durée des CGs des bandelettes du côlon moyen à l'état basal, durant les 5 premières (phase 1) et les 5 dernières minutes (phase 2) d'incubation avec le TEA 5 mM. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (basal et TEA: n = 7-13; témoin: n = 48). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: P ≤ 0.05, ns: P > 0.05.

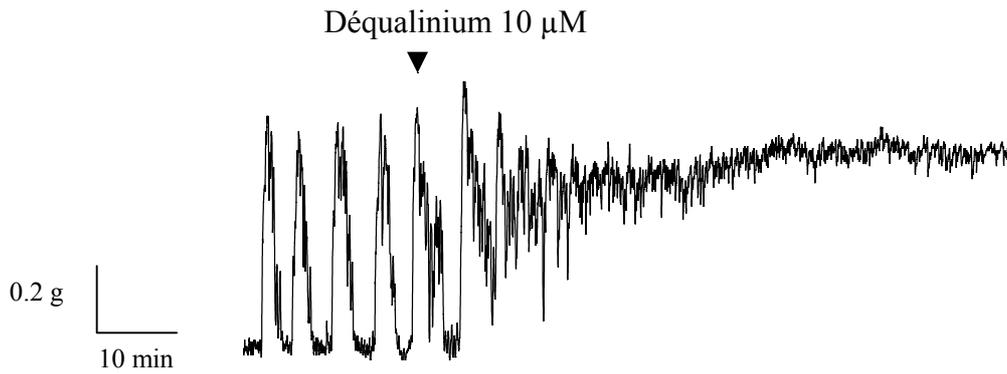


Figure 24. Enregistrement typique de l'addition cumulée de déqualinium sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

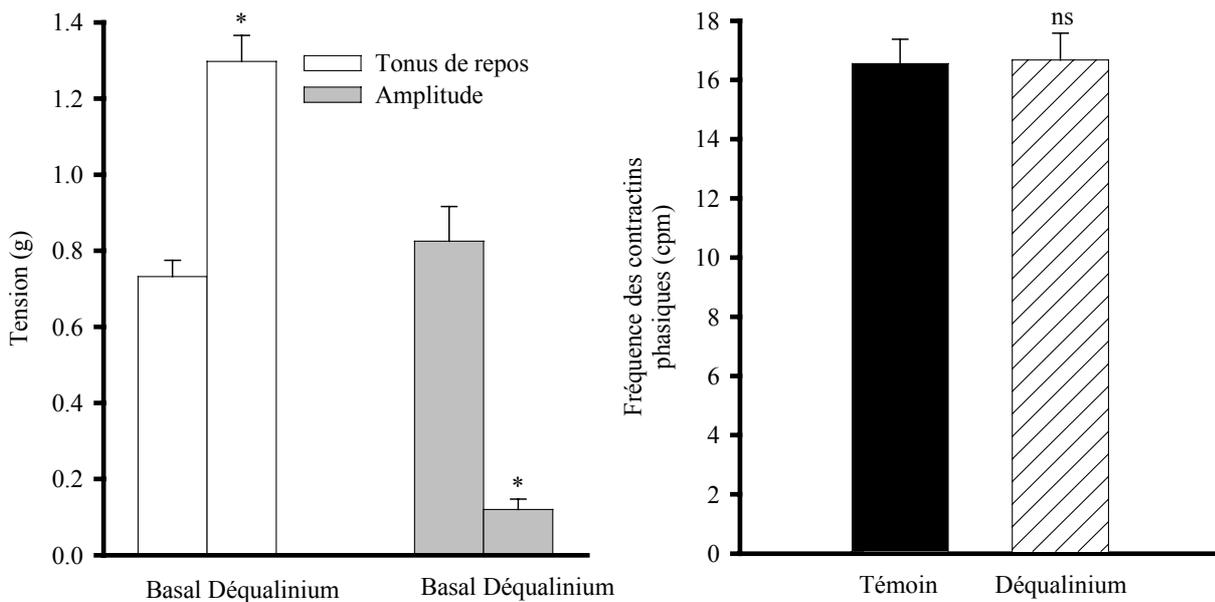


Figure 25. Le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions des bandelettes du côlon moyen à l'état basal et sous l'effet du déqualinium 10 μM. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (basal et déqualinium: n = 9; témoin: n = 48). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: P ≤ 0.05, ns: P > 0.05.

3.3. Effet du diazoxide

Le traitement des bandelettes circulaires du côlon moyen avec le diazoxide à des concentrations cumulées toutes les quinze minutes affecte les CGs de manière dépendante de la concentration (Fig. 26). Le diazoxide 10 μM n'a aucun effet significatif sur le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs. A 30 μM , la tension maximale des CGs diminue significativement de 1.56 ± 0.07 g à 1.15 ± 0.07 g ($n = 8$, $P \leq 0.05$). La fréquence des CGs est nettement réduite ($P \leq 0.05$), alors que la durée qui sépare deux CGs successives a tendance à augmenter ($P > 0.05$). A 100 μM , toute activité rythmique disparaît, mais un tonus de repos de 0.58 ± 0.07 g est maintenu pendant toute la durée d'incubation avec le diazoxide (Fig. 27).

4. Rôle de la voie nitroergique

4.1. Effet du L-NAME, de la L-arginine et du SNP

Le L-NAME (inhibiteur de la NOS) 100 μM ne modifie pas le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs (Fig. 28; 29).

Le traitement des bandelettes circulaires du côlon moyen avec la L-arginine (substrat de la NOS) 4 mM ne modifie pas le tonus de repos et la tension maximale des contractions (Fig. 28). Par contre, la fréquence des CGs diminue et leur durée augmente progressivement et atteint le seuil de signification vers la fin de l'incubation (Fig. 29).

L'incubation des bandelettes du côlon moyen avec le SNP (donneur du NO) à des concentrations cumulées toutes les 15 minutes induit un changement du profil général des contractions d'une façon qui dépend de la concentration (Fig. 30). La tension maximale des contractions diminue graduellement à partir de 1 μM pour atteindre 0.76 ± 0.12 g avec 100 μM ($P \leq 0.05$). La diminution significative de la fréquence des CGs à partir de 3 μM est accompagnée d'une diminution de la durée des CGs et d'une augmentation de la période du tonus de repos (Fig. 31).

4.2. Effet du bleu de méthylène

Le bleu de méthylène (inhibiteur de la guanyl cyclase) est ajouté aux bandelettes du côlon moyen à des concentrations cumulées (10, 30 et 100 μM) chaque 15 minutes (Fig. 32). A 10 μM , le bleu de méthylène convertit les CGs en contractions phasiques et augmente le tonus de repos de 0.54 ± 0.03 g à 0.92 ± 0.08 g ($n = 6$, $P \leq 0.05$). La fréquence des CGs n'est pas modifiée ($P > 0.05$). A partir de 30 μM , l'activité contractile disparaît, sauf qu'un tonus de repos de 1.13 ± 0.09 g est noté avec la plus forte concentration (Fig. 33).

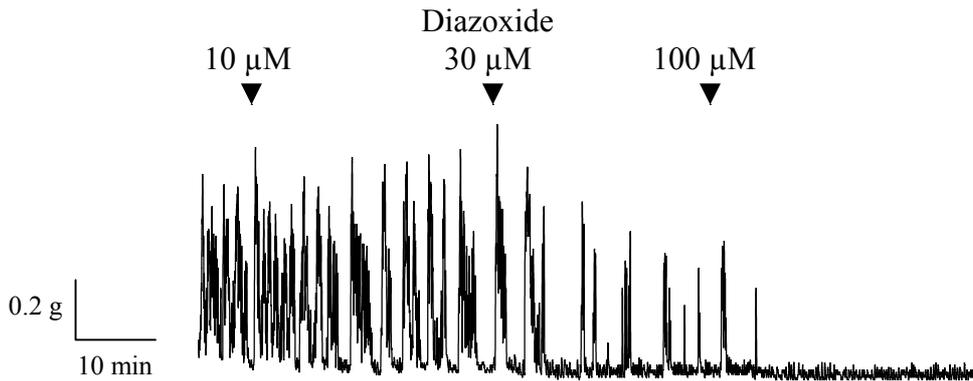


Figure 26. Enregistrement typique de l'addition cumulée de diazoxide sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

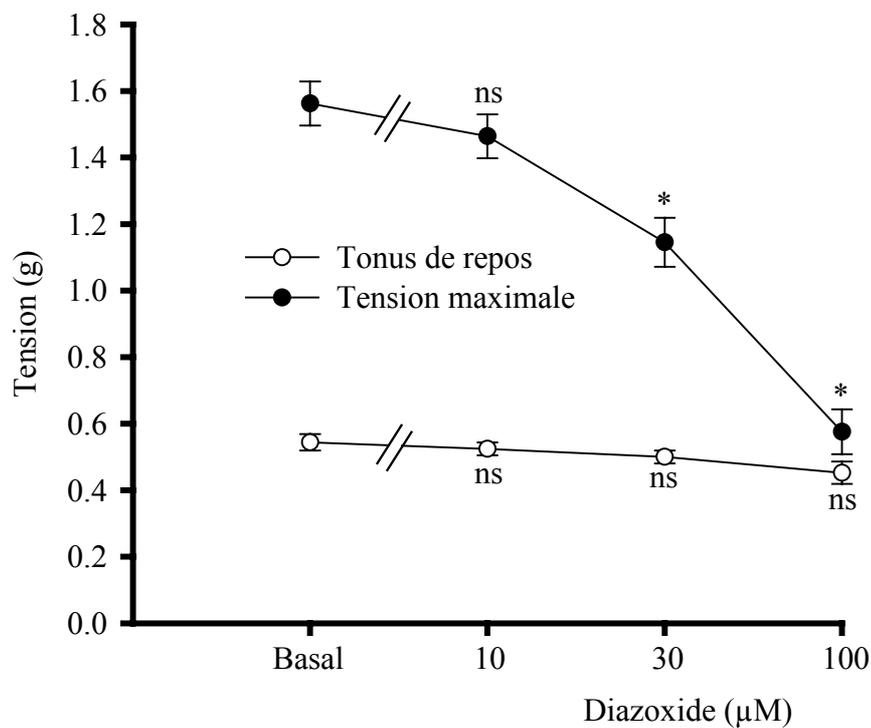


Figure 27. Effet de l'addition cumulée de diazoxide sur le tonus de repos et la tension maximale des bandelettes du côlon moyen. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 7-8). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

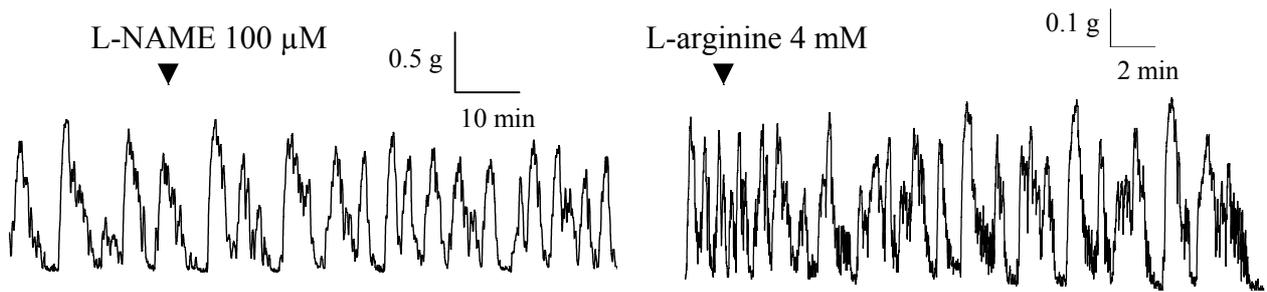


Figure 28. Enregistrements typiques de l'effet du L-NAME et de la L-arginine sur la contraction des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

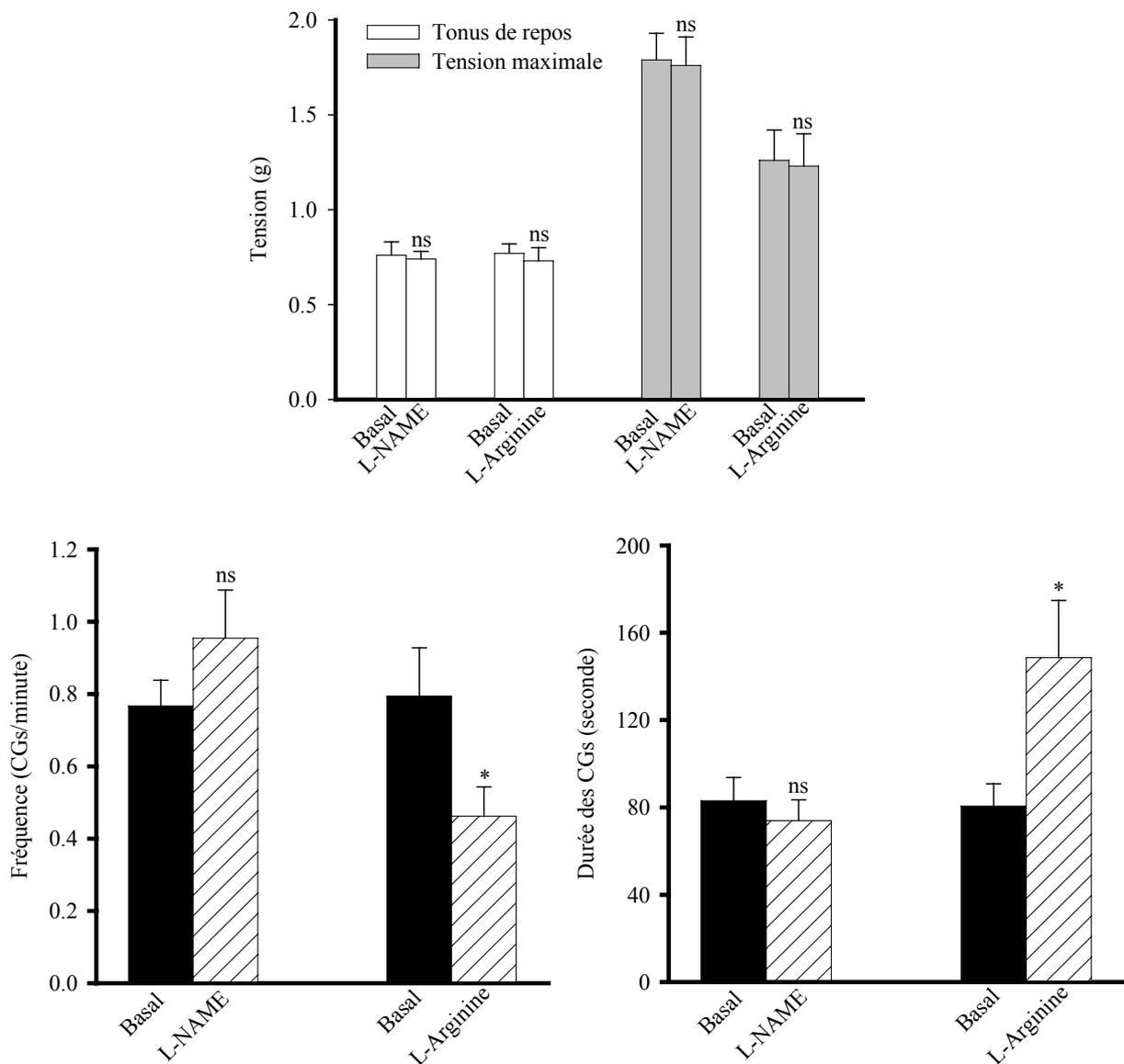


Figure 29. Le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs des bandelettes du côlon moyen à l'état basal (B) et sous l'effet du L-NAME 100 μ M et de la L-arginine 4 mM. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5-8). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

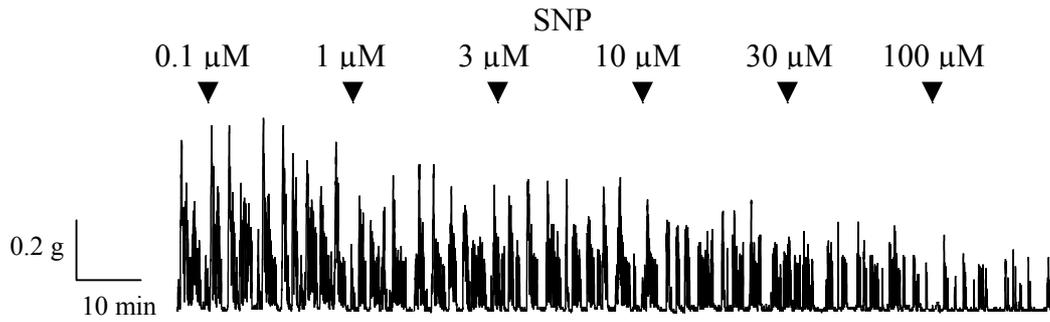


Figure 30. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée du SNP sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

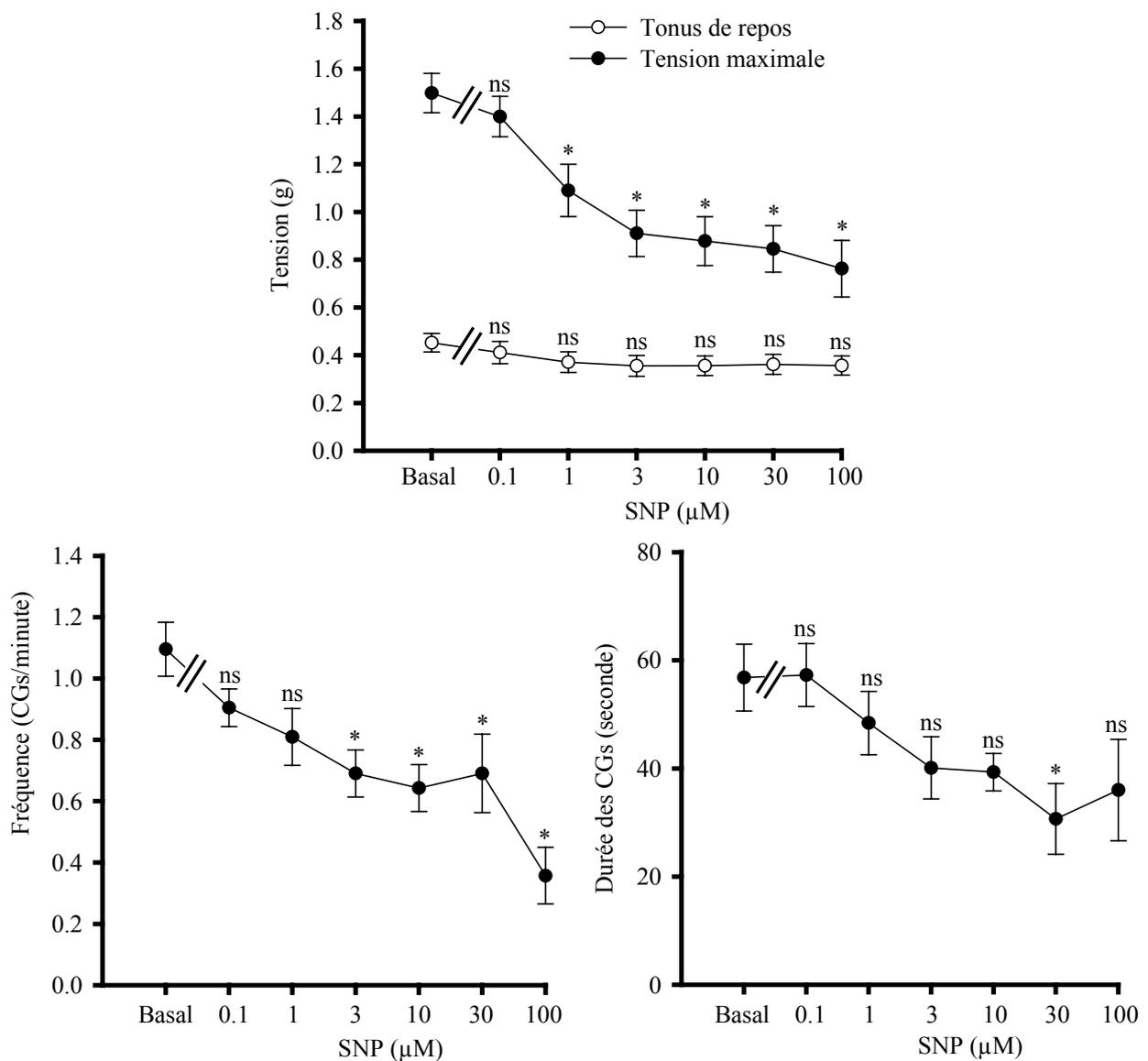


Figure 31. Effet de l'addition cumulée du SNP sur le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs des bandelettes du côlon moyen. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6-7). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

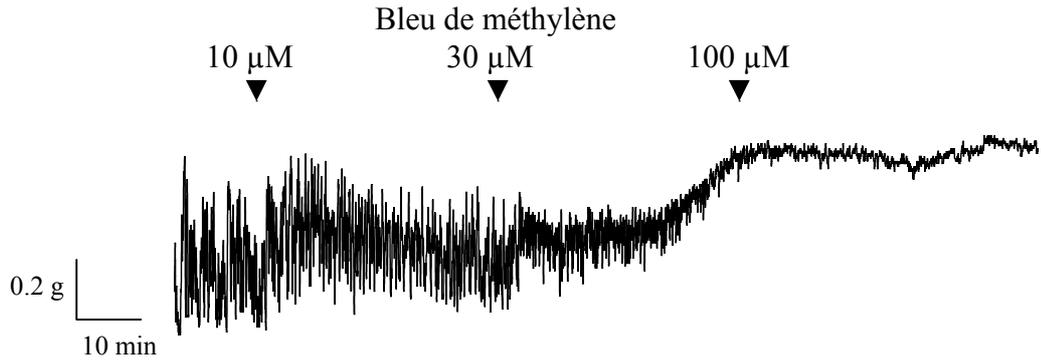


Figure 32. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée du bleu de méthylène sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

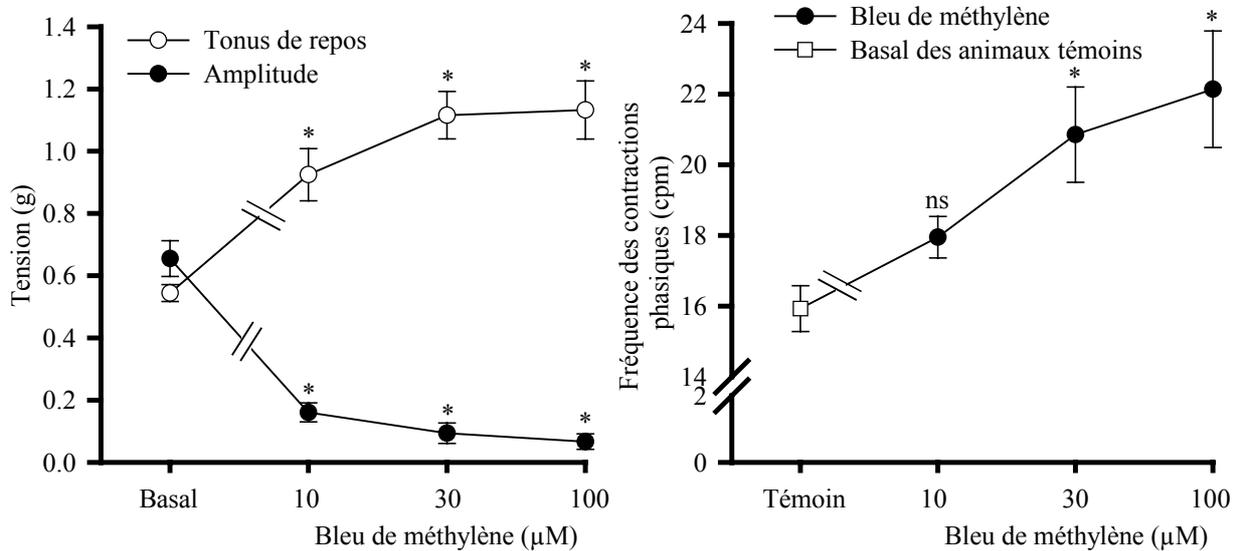


Figure 33. Effet de l'addition cumulée de bleu de méthylène sur le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 6$). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale ou par rapport au témoin (animaux témoins). *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

5. Effets de l'orthovanadate sur l'activité mécanique

L'orthovanadate (inhibiteur des tyrosines phosphatases) est ajouté à des concentrations cumulées aux bandelettes du côlon moyen. Le vanadate convertit les CGs en contractions phasiques dès 30 μM et augmente le tonus de repos (Fig. 34). L'amplitude des contractions est réduite significativement de 0.71 ± 0.12 g à l'état basal à 0.11 ± 0.02 g ($n = 6 - 8$, $P \leq 0.05$) après traitement avec 1000 μM . La fréquence des contractions phasiques n'est pas modifiée après l'application du vanadate ($P > 0.05$, Fig. 35).

6. Effets de la flavone et de la quercétine sur les contractions géantes

Afin d'étudier l'effet des flavonoïdes sur les CGs, la flavone et la quercétine sont incubées à des concentrations cumulées (1 - 100 μM) avec les bandelettes des trois régions du côlon. Les deux flavonoïdes diminuent l'activité contractile d'une façon qui dépend de la concentration. Le traitement des bandelettes avec le DMSO ou la NaOH (véhicules) n'a pas d'effet significatif sur l'amplitude des CGs (basal: 0.51 ± 0.06 g, DMSO: 0.50 ± 0.07 g, $n = 5$; $P > 0.05$; basal: 0.79 ± 0.17 g, NaOH: 0.88 ± 0.11 g, $n = 4$; $P > 0.05$).

L'addition cumulée de la flavone diminue graduellement le tonus de repos des préparations musculaires des trois régions du côlon. Celui-ci est significativement diminué à partir de 100 μM pour le côlon proximal (0.52 ± 0.05 g, $n = 6$; $P \leq 0.05$), de 30 μM pour le côlon moyen (0.57 ± 0.02 g, $n = 7$) et de 60 μM pour le côlon distal (0.35 ± 0.04 g, $n = 7$).

L'allure des CGs change en augmentant la concentration de la flavone (Fig. 36). Entre 30 et 60 μM , la durée des CGs augmente d'une manière significative, se traduisant par une prolongation de la phase de relaxation dans 39% des bandelettes testées (30 μM) et dans 70% des cas à 60 μM . La phase de relaxation est caractérisée par l'apparition de contractions phasiques dont l'amplitude moyenne est de 0.18 ± 0.01 g et la fréquence moyenne est de 15.8 ± 0.84 cpm (Fig. 36). A 100 μM , toute activité rythmique disparaît et seul un tonus de repos persiste. Ces effets sont accompagnés d'une diminution significative de l'amplitude des contractions à partir de 60 μM pour les trois régions (Fig. 37). Une différence significative est observée entre les deux premières régions et le côlon distal (proximal: 0.15 ± 0.07 g, $n = 6$; moyen: 0.21 ± 0.06 g, $n = 7$; distal: 0.38 ± 0.09 g, $n = 7$; $P \leq 0.05$). Par contre, la fréquence des CGs est diminuée significativement à partir de 10 μM et atteint des valeurs très basses à 60 μM (proximal: 0.14 ± 0.07 cpm, $n = 6$; moyen: 0.19 ± 0.10 cpm, $n = 7$; distal: 0.33 ± 0.07 cpm, $n = 7$; $P \leq 0.05$) sans aucune différence significative entre les trois régions (Fig. 38).

En présence de la quercétine, le tonus de repos n'est pas modifié ($P > 0.05$). Aucune différence significative n'est notée entre les trois régions du côlon. A la différence de la flavone, la

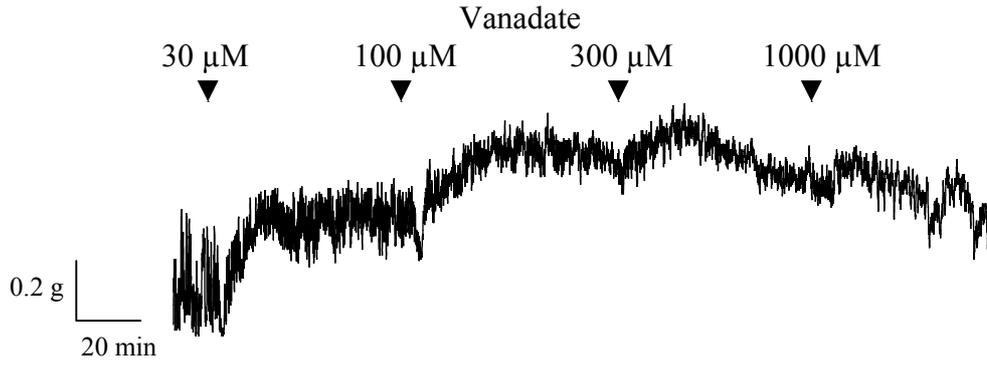


Figure 34. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée du vanadate sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon moyen. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

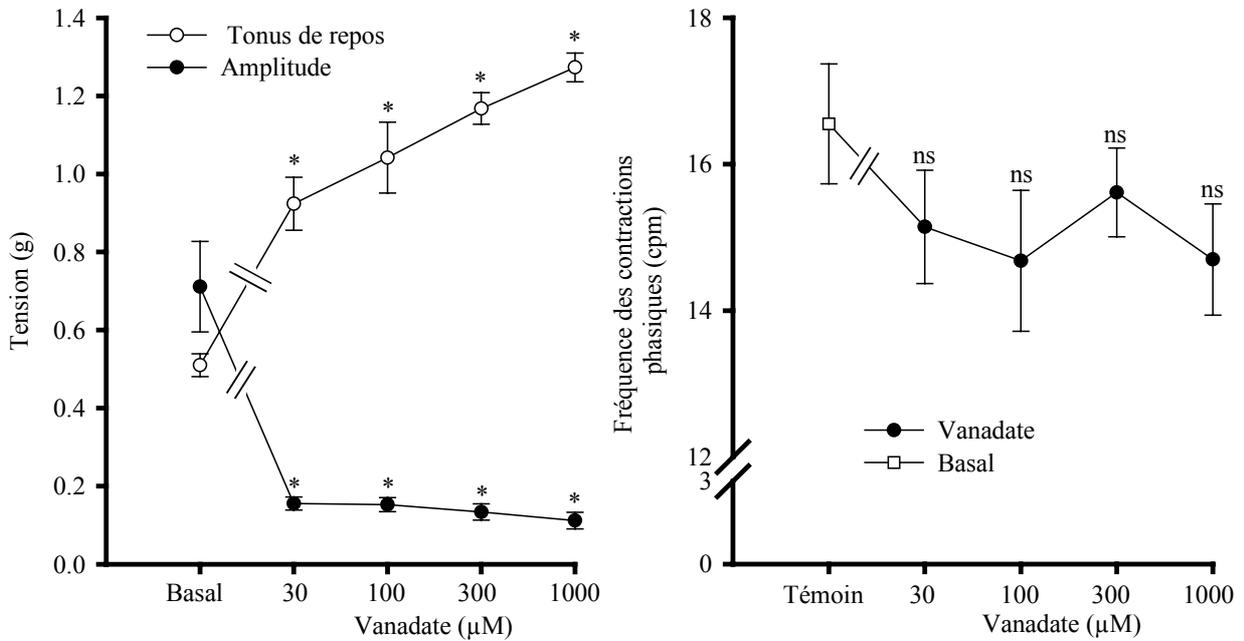


Figure 35. Effet de l'addition cumulée du vanadate sur le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 8$). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale ou par rapport au témoin (animaux témoins). *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

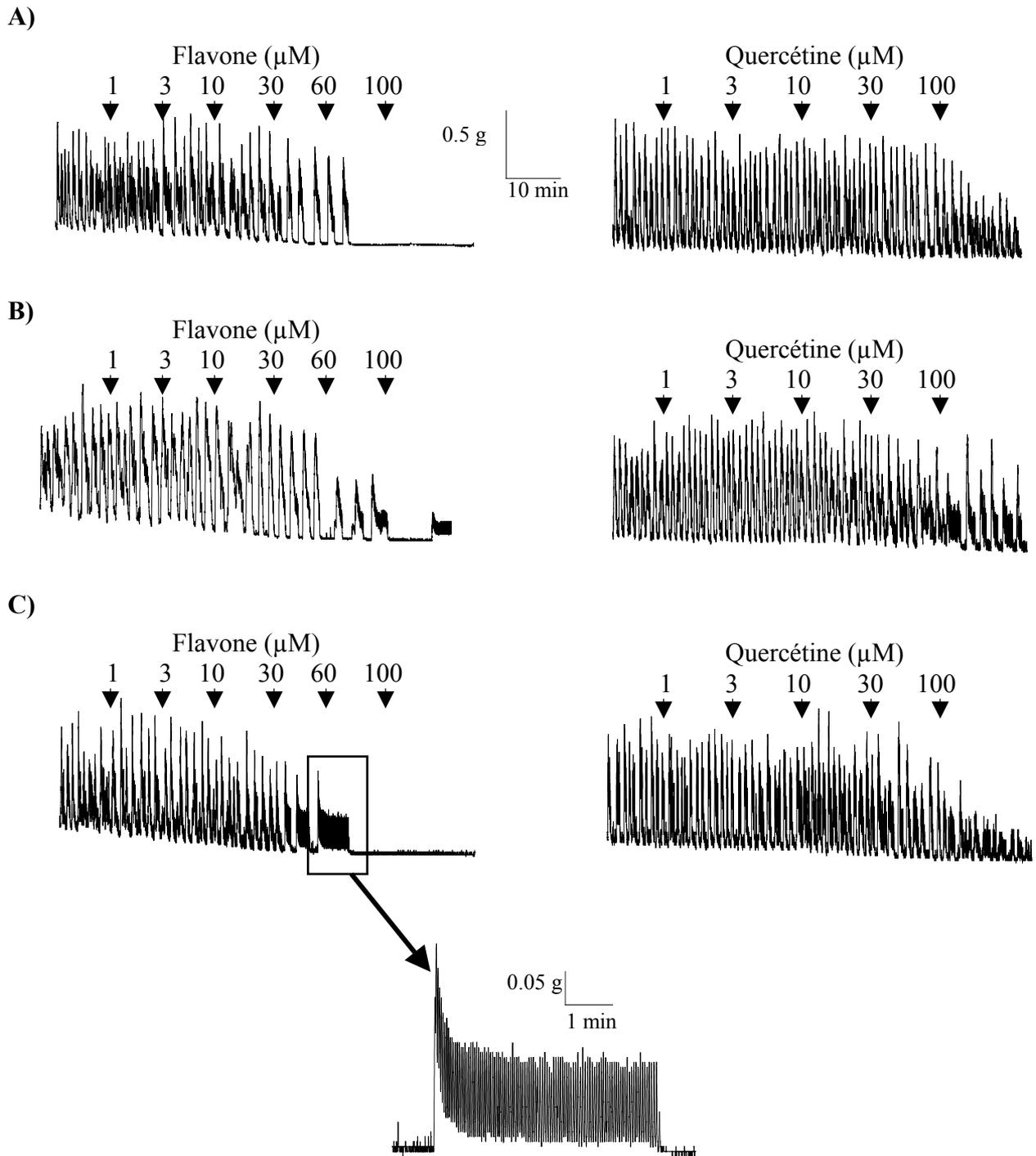


Figure 36. Enregistrements typiques de l'effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la contraction spontanée des bandelettes du côlon proximal (A), moyen (B) et distal (C). La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

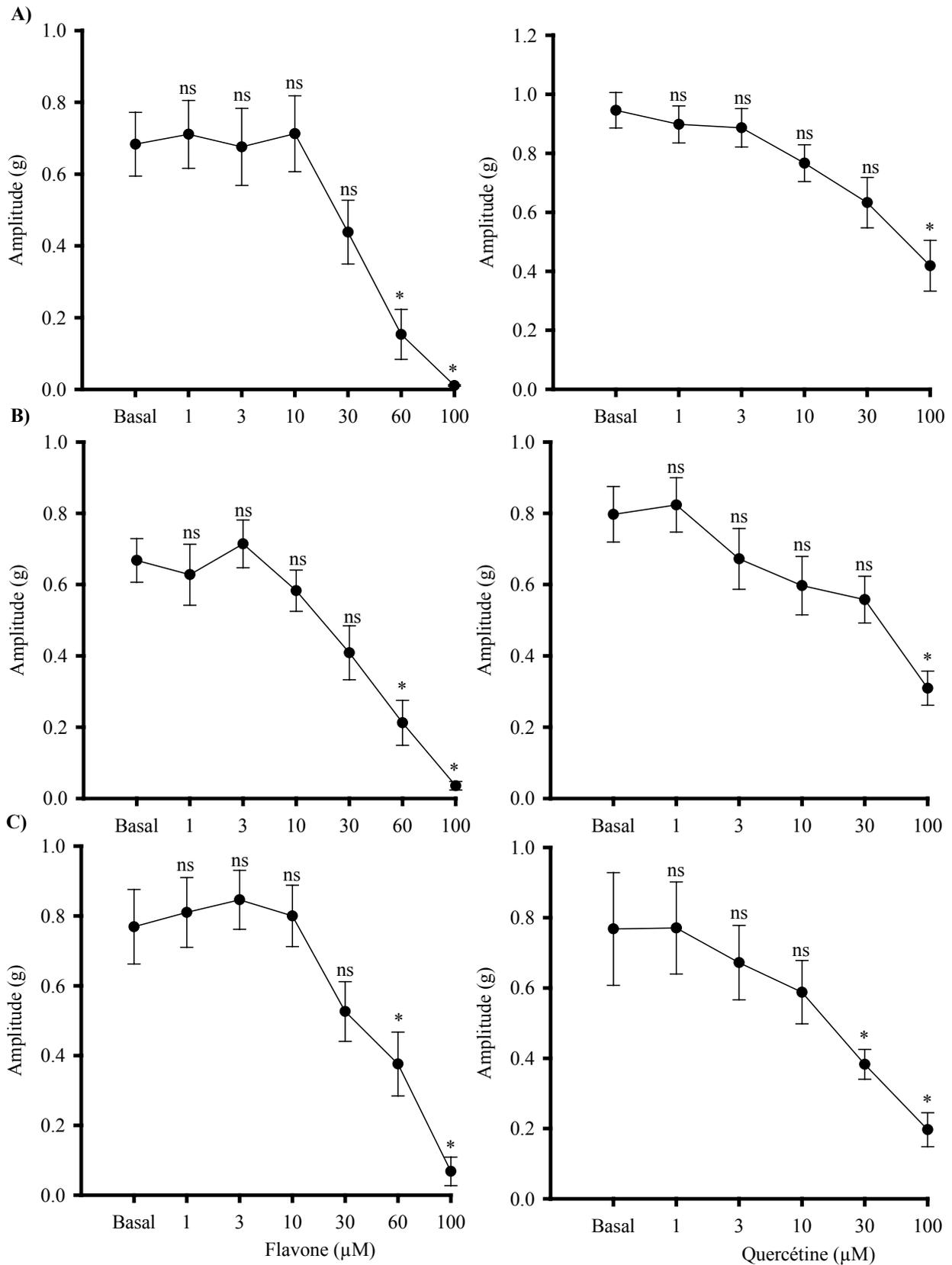


Figure 37. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur l'amplitude des contractions spontanées des bandelettes du côlon proximal (A), moyen (B) et distal (C). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6 - 8). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

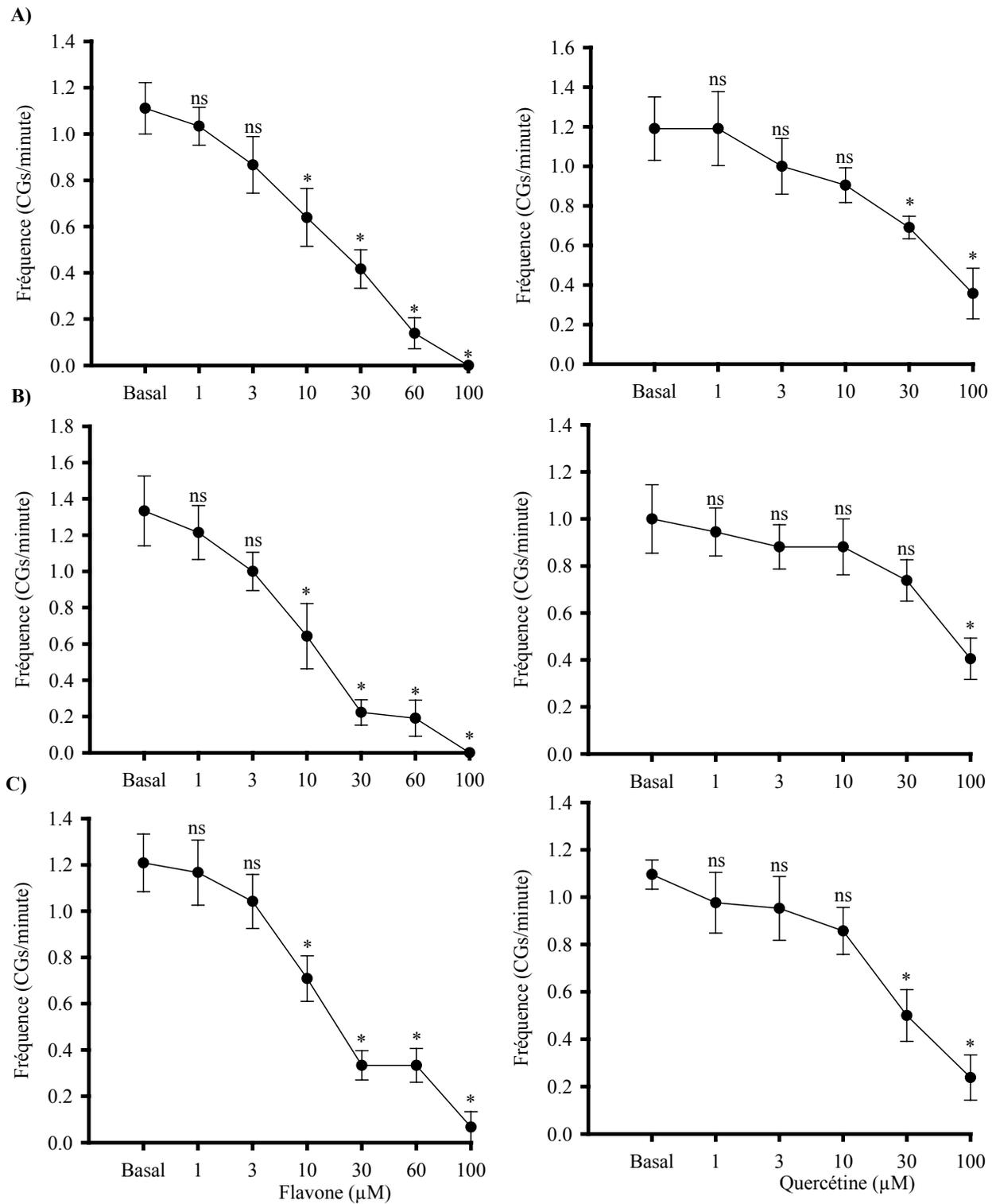


Figure 38. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la fréquence des CGs des bandelettes du côlon proximal (A), moyen (B) et distal (C). Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 6 - 8). Les comparaisons sont effectuées par rapport à la période basale. *: P ≤ 0.05, ns: P > 0.05.

quercétine maintient l'allure générale des CGs. Cependant, l'amplitude des CGs est significativement diminuée à partir de 100 μM pour le côlon proximal et moyen et à partir de 30 μM pour le côlon distal (Fig. 37), ce qui est probablement à l'origine de la différence notée entre les régions proximale et distale ($P \leq 0.05$) pour la concentration 100 μM . Simultanément, la fréquence des CGs est significativement réduite pour atteindre une moyenne de 0.33 ± 0.05 cpm pour les trois régions avec la forte concentration de la quercétine (Fig. 38).

La comparaison entre la flavone et la quercétine a permis de montrer que pour la même concentration 100 μM , l'amplitude des CGs est beaucoup plus sensible à la flavone qu'à la quercétine pour les régions proximale et moyenne. L'activité rythmique est dans ce cas abolie par la quercétine dans seulement 43% des bandelettes contre 100% des cas avec la flavone.

7. Effets de la flavone et de la quercétine sur la contraction induite par le carbachol et le KCl

7.1. La contraction induite par le carbachol

L'incubation des bandelettes du côlon moyen avec le carbachol 10^{-5} M induit une contraction du tissu qui se manifeste sous forme d'une contraction phasique représentée par un pic et qui ne dure que quelques secondes suivie d'une contraction tonique prolongée (plateau) (Fig. 39). L'amplitude de la contraction phasique est de 2.28 ± 0.42 g, et celle de la contraction tonique est de 0.57 ± 0.08 g ($n = 10$), correspondant respectivement à 3.1 et 1.8 fois par rapport au tonus de repos.

L'addition cumulée de la flavone et de la quercétine au cours de la contraction tonique (carbachol 10^{-5} M) entraîne une relaxation du tissu exprimée en pour cent par rapport à la contraction tonique. La relaxation est significative à partir de 10 μM pour les deux flavonoïdes ($20.3 \pm 0.59\%$) et augmente graduellement avec la concentration pour atteindre 46.2% et 62.1% respectivement avec la quercétine et la flavone 100 μM (Fig. 40a). A cette concentration, le tissu est plus sensible à la flavone qu'à la quercétine. Il est à noter que la tension atteinte à 100 μM est légèrement au-dessous du tonus de repos pour les deux flavonoïdes ($P > 0.05$).

Pour tester la réversibilité de la relaxation induite par les deux flavonoïdes, le carbachol 10^{-5} M est ajouté après le renouvellement du milieu et stabilisation pendant 15 minutes. Dans ces conditions, le carbachol induit toujours une contraction biphasique dont l'amplitude de la contraction phasique est réduite de 41% après la quercétine 100 μM (carbachol avant la quercétine: 2.39 ± 0.59 g, carbachol après la quercétine: 1.40 ± 0.44 g, $n = 5 - 6$; $P > 0.05$) et de 30% après la flavone 100 μM (carbachol avant la flavone: 2.54 ± 0.67 g, carbachol après la flavone: 1.77 ± 0.24 g, $n = 5-6$; $P > 0.05$; Fig. 41).

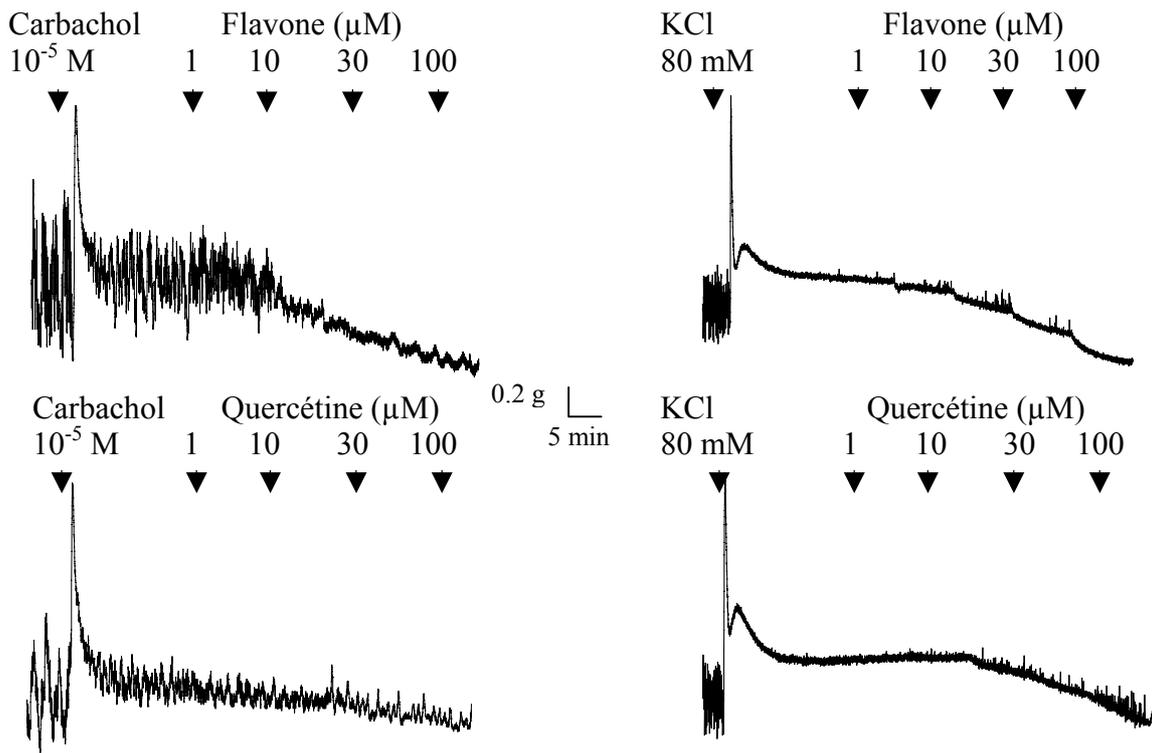


Figure 39. Enregistrements typiques de l'effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la contraction des bandelettes du côlon moyen induite par le carbachol et le KCl. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

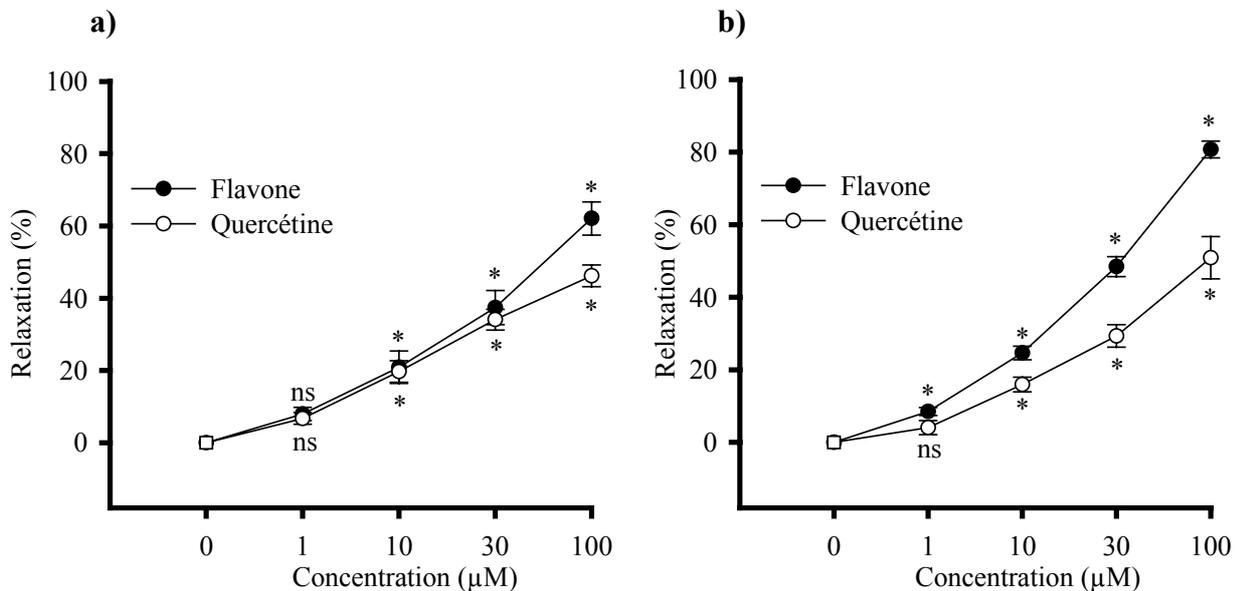


Figure 40. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la contraction tonique des bandelettes du côlon moyen induite par le carbachol 10^{-5} M (a) et le KCl 80 mM (b). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5-6); Les comparaisons sont effectuées par rapport au plateau du carbachol ou du KCl: *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

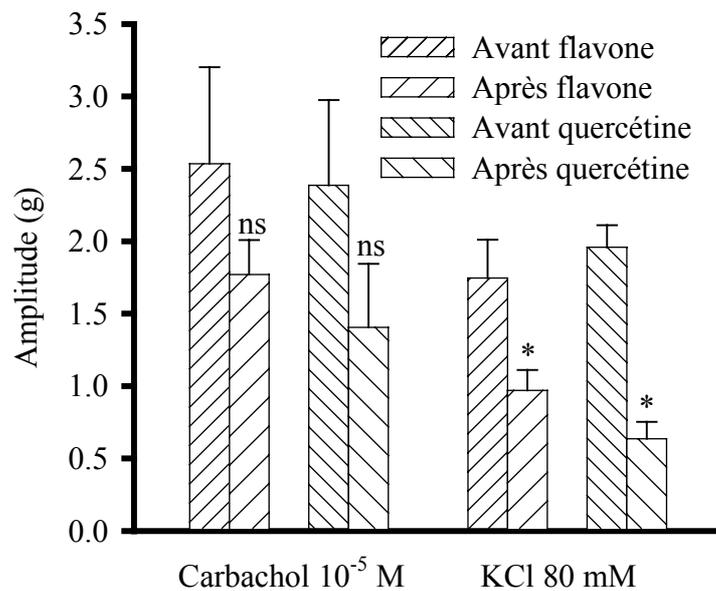


Figure 41. Réponse des bandelettes du côlon moyen au carbachol et au KCl avant et après traitement avec la flavone et la quercétine à des concentrations cumulées (1, 10, 30, et 100 μ M). Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5-6); Les comparaisons sont effectuées par rapport au premier traitement avec le carbachol ou le KCl. *: $P \leq 0.05$, ns: $P > 0.05$.

7.2. La contraction induite par le KCl

L'application du KCl 80 mM au côlon moyen induit une réponse biphasique: une contraction phasique (≈ 10 secondes) suivie d'une contraction tonique (Fig. 39). L'amplitude de la contraction phasique est de 1.93 ± 0.17 g et celle de la contraction tonique est de 0.55 ± 0.04 g ($n = 8$), correspondant respectivement à 2.6 et 1.7 fois par rapport au tonus de repos.

Lorsque la contraction tonique est stabilisée, l'addition cumulée de la quercétine et de la flavone induit une relaxation du tissu qui dépend de la concentration. La relaxation est significative à partir de 10 μ M pour la quercétine et 1 μ M pour la flavone. Le taux de relaxation augmente avec la concentration pour atteindre 51% dans le cas de la quercétine 100 μ M et 81% dans le cas de la flavone 100 μ M (Fig. 40b). La comparaison entre les deux flavonoïdes révèle une plus grande sensibilité du tissu vis-à-vis de la flavone à partir de 10 μ M. Une relaxation significative (63%) par rapport au tonus de repos est observée uniquement en présence de la flavone 100 μ M ($P \leq 0.05$).

Une seconde application du KCl après lavage et stabilisation pendant 15 minutes entraîne toujours une contraction biphasique mais dont l'amplitude de la contraction phasique est significativement réduite par rapport à la première addition de KCl (de 67% en présence de la quercétine et de 44% en présence de la flavone; Fig. 41).

La relaxation induite par la quercétine en réponse au KCl n'est pas différente de celle induite en réponse au carbachol ($P > 0.05$). Par contre, la relaxation induite par la flavone 100 μ M au cours de la contraction tonique due au KCl ($80.7 \pm 2.30\%$, $n = 5$) est plus grande que celle due au carbachol ($62.0 \pm 4.60\%$, $n = 6$, $P \leq 0.05$).

8. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+

Le DMSO et la NaOH 0.5 N n'ont aucun effet sur la réponse du tissu aux différents modulateurs des canaux potassiques (TEA, déqualinium et diazoxide), ce qui signifie que les effets de la flavone et de la quercétine sont indépendants de ces véhicules.

8.1. Blocage des canaux K^+ par le TEA

Les bandelettes du côlon moyen sont pré-incubées avec le TEA 5 mM avant de subir un traitement avec la flavone ou la quercétine à des concentrations cumulées (1 et 30 μ M). Pendant 15 minutes, le TEA maintient ou convertit les CGs en contractions phasiques (Fig. 42a; b).

Dans le cas où les CGs sont converties en contractions phasiques par le TEA, la flavone et la quercétine n'ont pas d'effet significatif sur le tonus et la fréquence des contractions

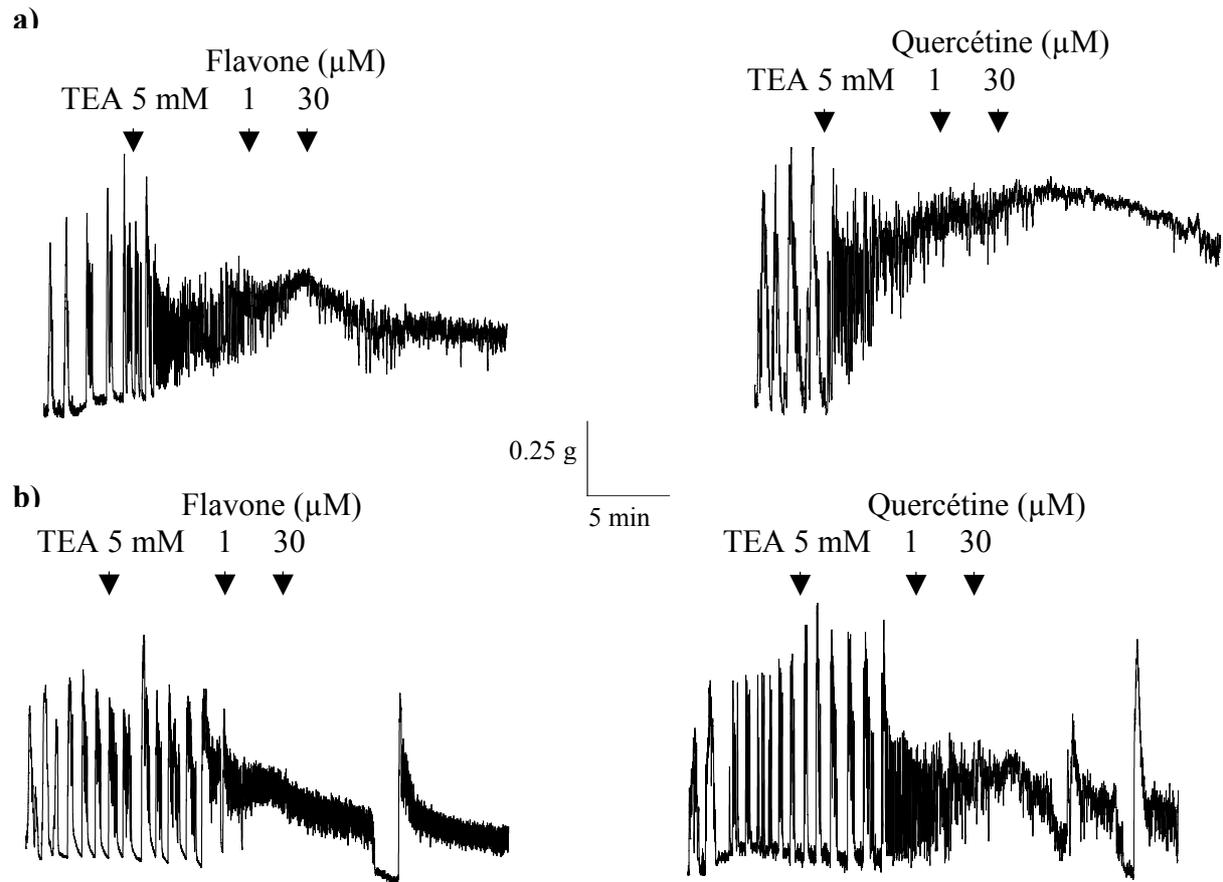


Figure 42. Enregistrements typiques de l'effet de l'addition cumulée de la quercétine et de la flavone sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence du TEA. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

a) Induction des contractions phasiques.

b) Maintien des CGs.

phasiques induites par le TEA. Cependant, l'amplitude des contractions phasiques est réduite de manière significative par la flavone 30 μM (TEA: 0.17 ± 0.04 g, flavone: 0.08 ± 0.01 , $n = 8$, $P \leq 0.05$) et la quercétine 30 μM (TEA: 0.19 ± 0.02 g, quercétine: 0.10 ± 0.02 g, $n = 10$, $P \leq 0.05$; Fig. 43).

Dans le cas où les CGs sont maintenues en présence du TEA, seule la flavone 30 μM diminue significativement la tension des CGs (Fig. 44). La fréquence des CGs est réduite significativement par la flavone et la quercétine 30 μM (Fig. 44). Ce dernier effet est dû à une augmentation significative de la durée des CGs dans les cas où elles sont observées sous traitement avec la flavone (3/6). La quercétine a aussi tendance à augmenter la durée des CGs ($P > 0.05$; Fig. 44).

La comparaison entre les deux flavonoïdes révèle une plus grande sensibilité du tissu vis-à-vis de la flavone à 30 μM .

Le traitement des bandelettes avec le TEA 5 mM après la flavone 30 μM induit la conversion des CGs, bien que réduites par la flavone ($P > 0.05$), en contractions phasiques (Fig. 45). Cependant, le tonus de repos est significativement réduit par la flavone de 28.7% et l'amplitude des contractions n'est pas significativement modifiée ($P > 0.05$) (Fig. 46).

8.2. Blocage des canaux K^+ par le déqualinium

L'incubation des bandelettes du côlon moyen avec le déqualinium 10 μM convertit les CGs en contractions phasiques (Fig. 47).

Les contractions phasiques induites par le déqualinium sont maintenues en présence de la flavone et de la quercétine 1 μM . Le tonus de repos est légèrement diminué (flavone 1 μM : 1.16 ± 0.06 g, $n = 9$; quercétine 1 μM : 1.20 ± 0.06 g, $n = 8$, $P > 0.05$) et l'amplitude des contractions n'est pas modifiée ($P > 0.05$) (Fig. 48). En présence de la flavone et de la quercétine 30 μM , il est noté une reprise de l'activité basale vers la fin de l'incubation (taux d'incidence: 4/8 et 8/8 respectivement pour la flavone et la quercétine). Le tonus de repos est significativement réduit par rapport à celui noté en présence du déqualinium (flavone 30 μM : $30.1 \pm 6.49\%$, quercétine 30 μM : $41.7 \pm 3.91\%$, $n = 8-9$, $P \leq 0.05$; Fig. 48). Cependant, le tonus de repos est un peu plus élevé que celui noté au cours de la période basale ($P > 0.05$). L'amplitude des CGs à la fin de l'incubation est significativement réduite seulement avec la flavone ($67.3 \pm 6.39\%$, $n = 8$, $P \leq 0.05$) par rapport à la période basale.

Lorsque la flavone 30 μM est appliquée avant le déqualinium 10 μM , ce dernier continue à convertir les CGs, bien que préalablement réduites par la flavone, en contractions phasiques (Fig. 49). Cependant, le tonus de repos induit par le déqualinium est significativement réduit par la flavone de 24% environ, mais l'amplitude reste inchangée ($P > 0.05$; Fig. 50).

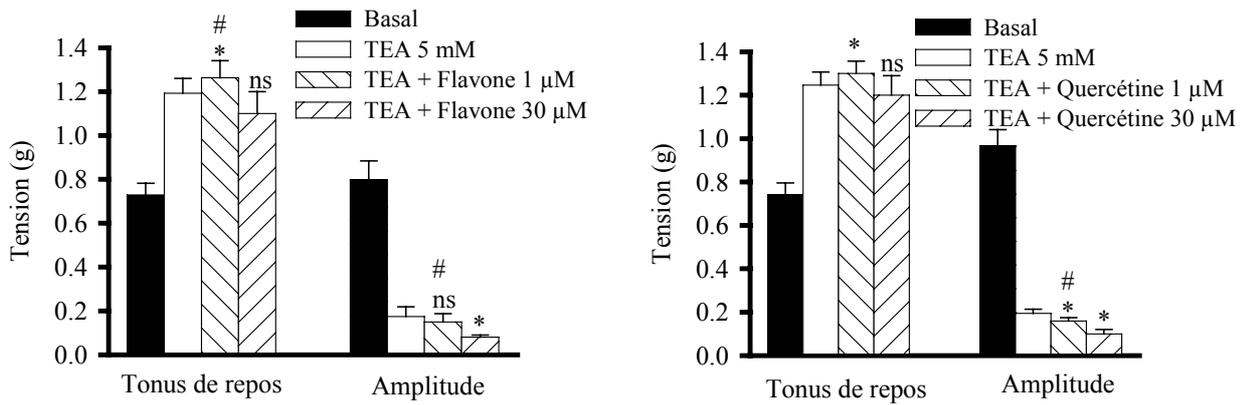


Figure 43. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la conversion des CGs en contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen par le TEA. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 8-10). *: Comparaisons par rapport au TEA, $P \leq 0.05$. ns: $P > 0.05$. #: Comparaison par rapport à la concentration 30 μ M.

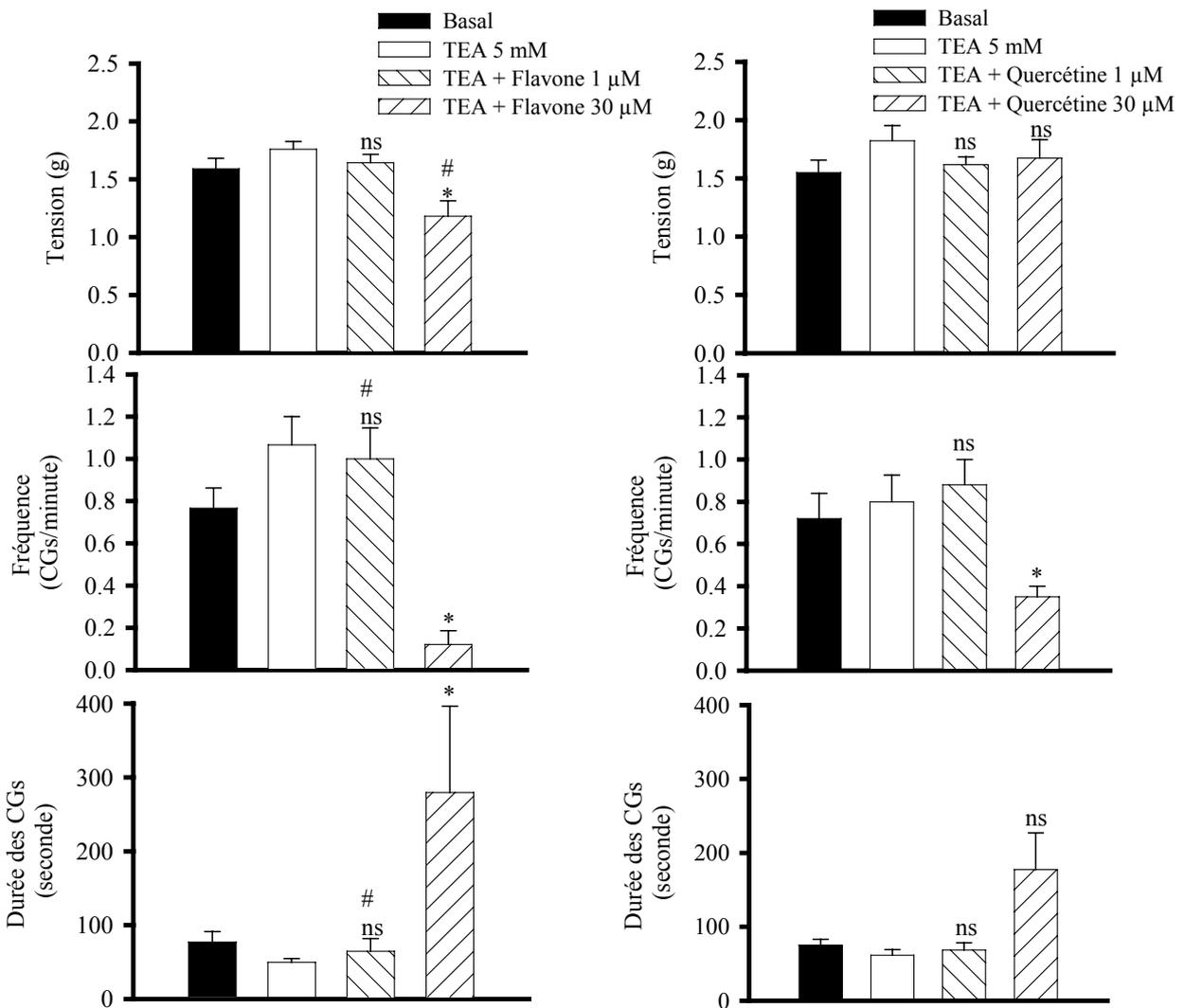


Figure 44. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur le maintien des CGs des bandelettes du côlon moyen par le TEA. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5-10). *: Comparaisons par rapport au TEA, $P \leq 0.05$. ns: $P > 0.05$. #: Comparaison par rapport à la concentration 30 μ M.

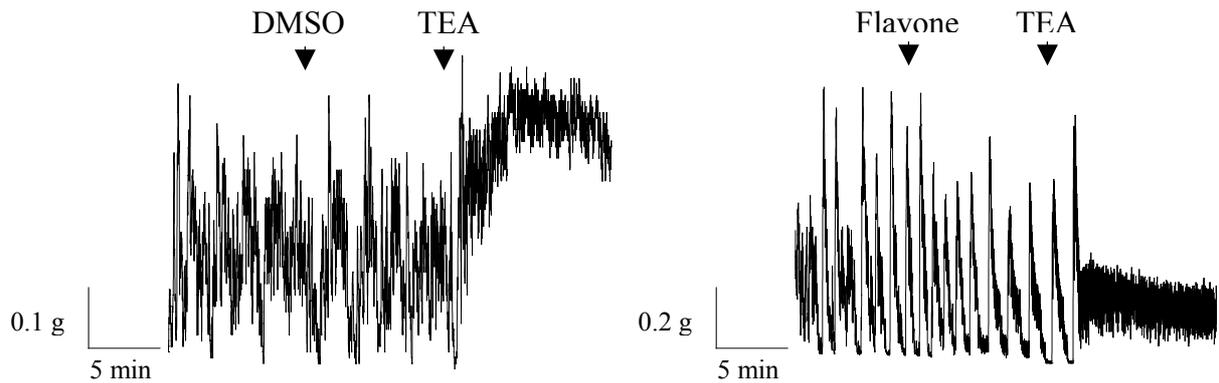


Figure 45. Enregistrements typiques de l’effet de TEA 5 mM sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de DMSO et de la flavone 30 μ M. La vitesse d’échantillonnage est de 2 Hz.

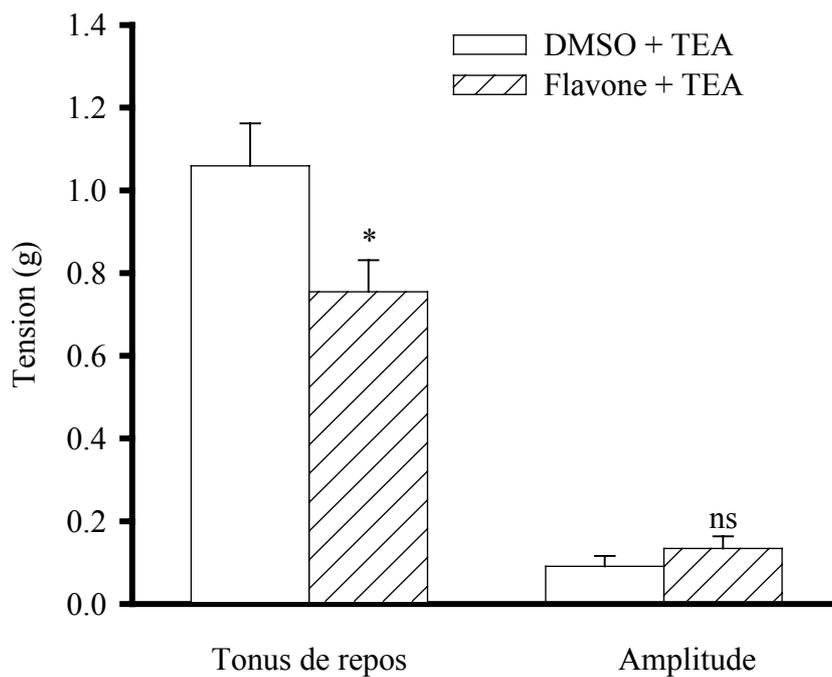


Figure 46. Effet de la flavone 30 μ M sur la réponse des bandelettes du côlon moyen au TEA 5 mM. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6). *: Comparaison par rapport au DMSO + TEA ($P \leq 0.05$), ns: $P > 0.05$.

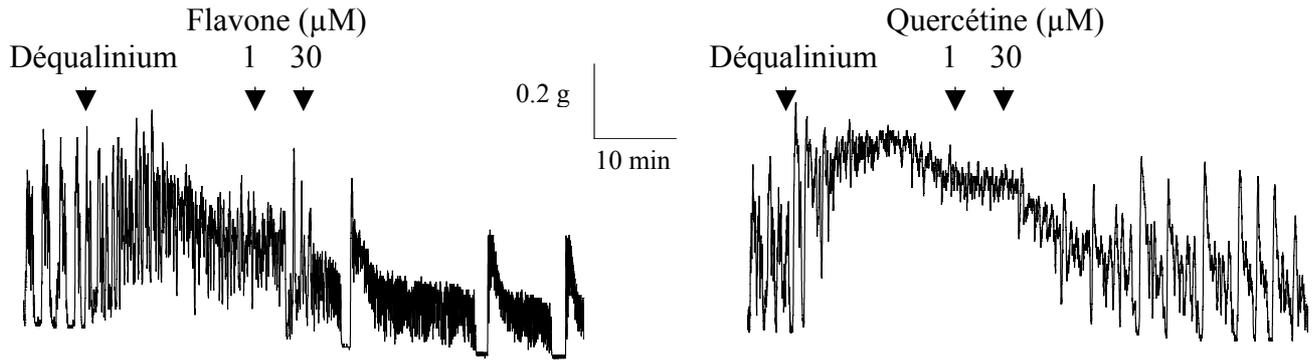


Figure 47. Enregistrements typiques de l'effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de dèqualinium 10 μM. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

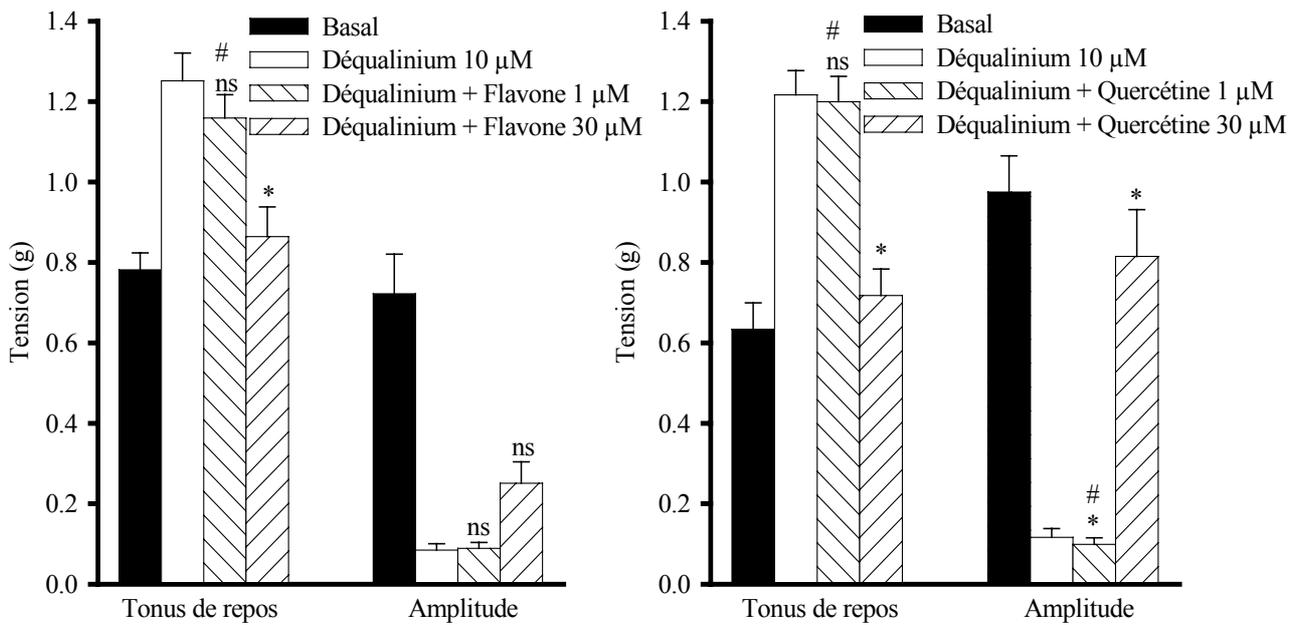


Figure 48. Effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur le tonus de repos et l'amplitude des contractions des bandelettes du côlon moyen en présence de dèqualinium. Les valeurs sont la moyenne ± SEM (n = 9-11). *: Comparaisons par rapport au dèqualinium, P ≤ 0.05. ns: P > 0.05. #: Comparaison par rapport à la concentration 30 μM.

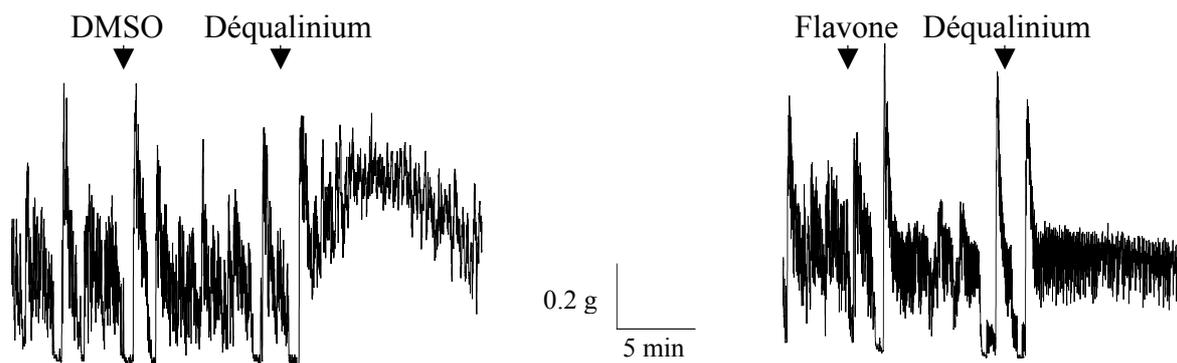


Figure 49. Enregistrements typiques de l'effet de déqualinium 10 μ M sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de DMSO et de la flavone 30 μ M. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

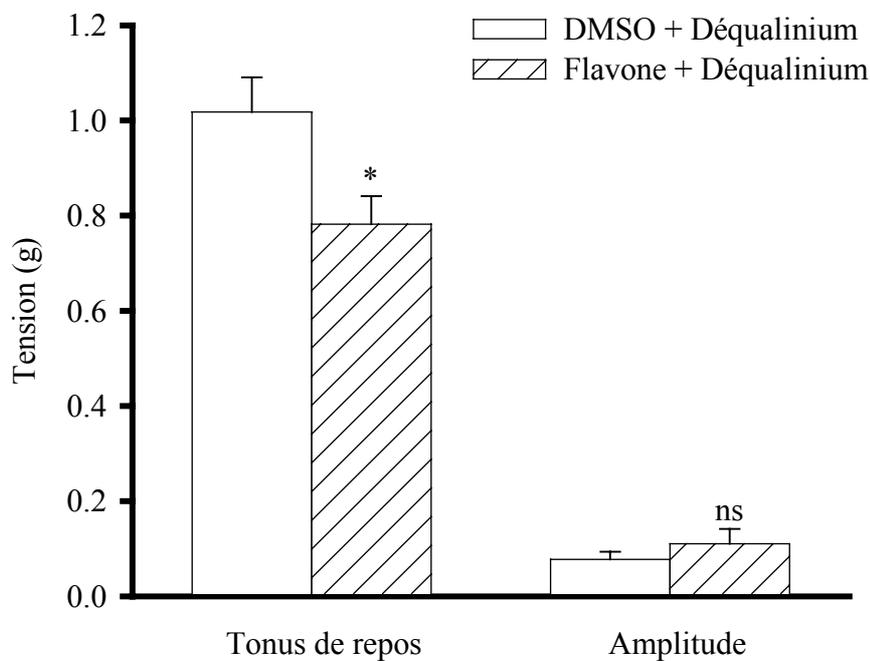


Figure 50. Effet de la flavone 30 μ M sur la réponse des bandelettes du côlon moyen au déqualinium 10 μ M. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5). *: Comparaison par rapport au DMSO + déqualinium ($P \leq 0.05$), ns: $P > 0.05$.

8.3. Ouverture des canaux K^+ par le diazoxide

Les bandelettes du côlon moyen sont incubées avec le diazoxide 100 μM avant de subir un traitement avec la flavone ou la quercétine 1 et 30 μM ajoutées d'une manière cumulée. Le diazoxide induit la disparition de toute activité rythmique et seul un tonus de repos de 0.64 ± 0.02 g est maintenu pendant les 30 minutes d'incubation (Fig. 51).

L'application de la flavone et de la quercétine 1 μM n'a aucun effet sur le tonus de repos en présence de diazoxide 100 μM . A 30 μM , la quercétine ne modifie pas la réponse du tissu au diazoxide 100 μM , par contre, la flavone augmente le tonus de repos de 0.63 ± 0.06 g à 0.75 ± 0.06 g ($n = 8$, $P \leq 0.05$) et entraîne une reprise de l'activité phasique (amplitude: diazoxide: 0.03 ± 0.01 g, flavone 30 μM : 0.12 ± 0.03 g; fréquence des contractions phasiques: diazoxide: 0 cpm, flavone 30 μM : 19.3 ± 1.8 cpm, $n = 7-8$, $P \leq 0.05$).

L'analyse statistique montre l'existence d'une différence significative entre la flavone et la quercétine à 30 μM .

9. Effets de la flavone en présence du L-NAME et du SNP

Les préparations musculaires du côlon moyen sont incubées avec le L-NAME 100 μM pendant 15 minutes avant de subir un traitement avec la flavone 30 μM pendant 30 minutes. Le L-NAME n'a aucun effet sur la contraction spontanée (Fig. 52). En comparaison avec le L-NAME, le tonus de repos et l'amplitude des contractions ne sont pas modifiés suite à l'application de la flavone ($P > 0.05$) (Fig. 53). Cependant, la fréquence des CGs est réduite significativement, elle passe de 0.95 ± 0.13 cpm avec le L-NAME à 0.25 ± 0.08 cpm avec la flavone ($n = 8$, $P \leq 0.05$, Fig. 53). Cette diminution de la fréquence est engendrée par une prolongation de la durée du tonus de repos et de celle des CGs (L-NAME: 68.1 ± 8.68 secondes, flavone: 174 ± 39.5 secondes, $n = 5 - 8$, $P \leq 0.05$, Fig. 53).

Afin d'étudier l'effet de la flavone en présence du SNP 100 μM , les bandelettes sont incubées avec ce dernier pendant 15 minutes puis subissent un traitement avec la flavone 30 μM ou son véhicule (DMSO) pendant 30 minutes. Le SNP 100 μM induit la disparition des CGs et seul un tonus de repos persiste (0.77 ± 0.11 g, $n = 8$) après 15 minutes d'incubation (Fig. 54). La prolongation du temps d'incubation (en présence de DMSO) permet de noter une reprise des CGs avec une amplitude réduite de manière significative (basal: 0.68 ± 0.16 g; SNP + DMSO: 0.33 ± 0.07 g, $n = 8$, $P \leq 0.05$) et un tonus de repos légèrement réduit (basal: 0.69 ± 0.05 g, SNP + DMSO: 0.52 ± 0.07 g, $n = 8$, $P > 0.05$). La flavone ne modifie pas l'effet inhibiteur du SNP, par contre, elle empêche le tissu de reprendre l'activité contractile normalement développée après 15 minutes d'incubation avec la combinaison (SNP + DMSO).

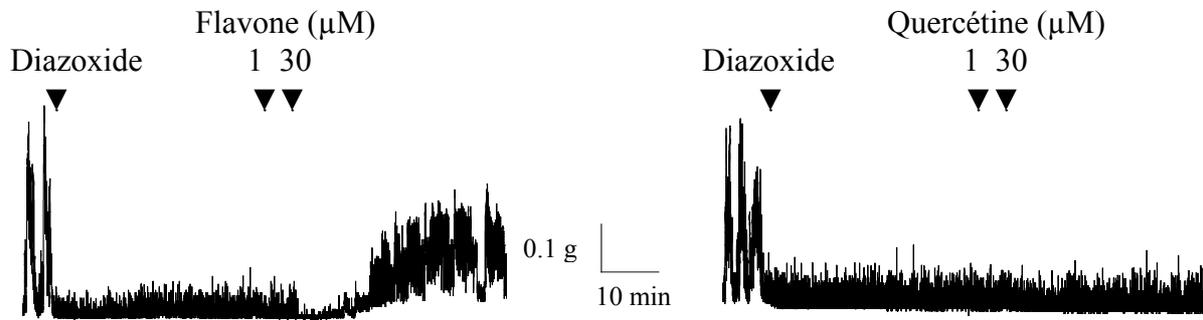


Figure 51. Enregistrements typiques de l'effet de l'addition cumulée de la flavone et de la quercétine sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de diazoxide 100 μM . La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

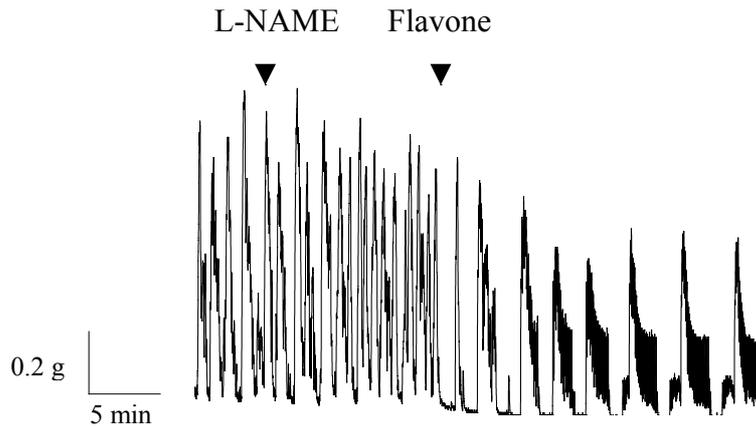


Figure 52. Enregistrement typique de l'effet de la flavone 30 μ M sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence du L-NAME 100 μ M. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

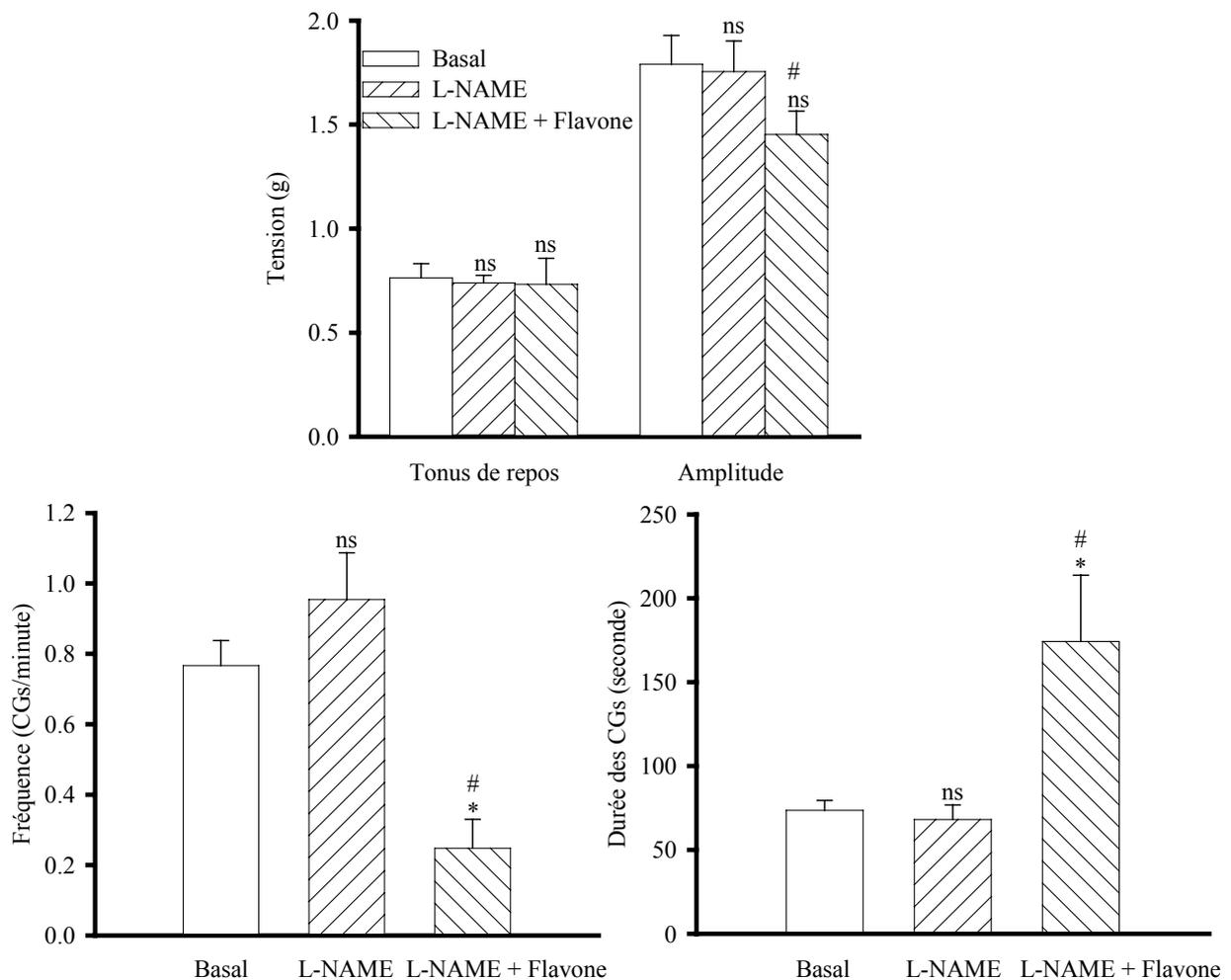


Figure 53. Effet de la flavone 30 μ M sur le tonus de repos, la tension maximale, la fréquence et la durée des CGs des bandelettes du côlon moyen en présence du L-NAME 100 μ M. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5 - 8). *: Comparaison par rapport au L-NAME ($P \leq 0.05$); #: Comparaison par rapport à la période basale.

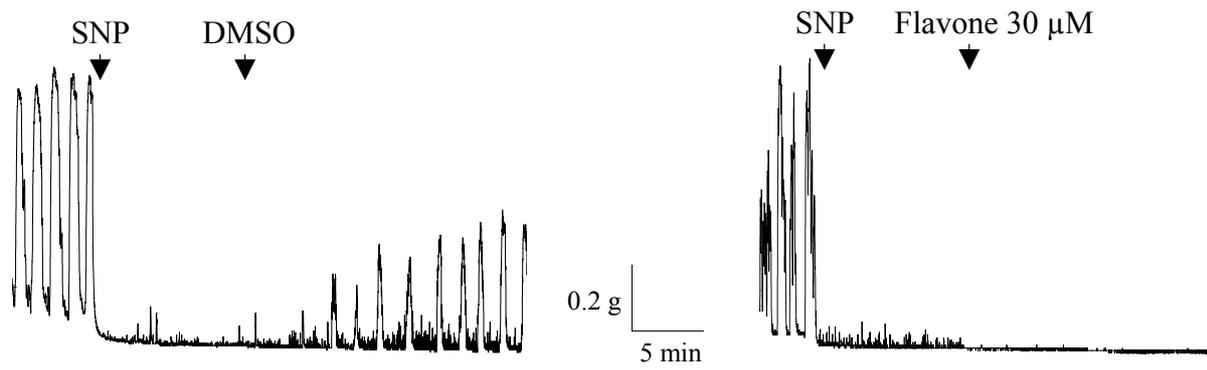


Figure 54. Enregistrement typique de l'effet de la flavone et du DMSO sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence du SNP 100 μM. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

10. Interférence de la flavone avec la néostigmine, le bleu de méthylène et le vanadate

10.1. Effets en présence de la néostigmine

La flavone est ajoutée au milieu d'incubation à des concentrations cumulées (30 et 100 μM) quinze minutes après l'addition de la néostigmine. A 10 μM , la néostigmine convertit les CGs en contractions phasiques (tonus de repos: 1.66 ± 0.20 g, amplitude: 0.13 ± 0.03 g, $n = 5$; Fig. 55). Après application de la flavone, le tonus de repos diminue progressivement pour atteindre le seuil de signification avec la concentration 100 μM (Fig. 56). L'amplitude des contractions est significativement réduite à partir de 30 μM de la flavone. Elle passe de 0.13 ± 0.03 g avec la néostigmine à 0.05 ± 0.01 g avec la plus forte concentration de la flavone ($n = 5$, $P \leq 0.05$, Fig. 56). La fréquence des contractions phasiques est augmentée d'une manière significative suite à l'application de la flavone (néostigmine: 8.84 ± 0.98 cpm, flavone: 17.58 ± 1.75 cpm, $n = 5$, $P \leq 0.05$, Fig. 56).

10.2. Effets en présence du bleu de méthylène

L'inhibition de la guanyl cyclase par le bleu de méthylène 100 μM atteint par addition cumulée convertit les CGs en contractions phasiques (Fig. 57). L'addition de la flavone à des concentrations cumulées 30 et 100 μM entraîne une diminution progressive du tonus de repos pour atteindre 0.42 ± 0.03 g ($n = 6$, $P \leq 0.05$; Fig. 58) ainsi que la valeur de l'amplitude (bleu de méthylène: 0.07 ± 0.02 g, bleu de méthylène + flavone 100 μM : 0.03 ± 0.02 g, $n = 6$, $P \leq 0.05$; Fig. 58).

L'application du bleu de méthylène 100 μM après la flavone 30 μM convertit les CGs en contractions phasiques (Fig. 59) mais dont le tonus de repos est réduit de 30% par rapport au contrôle (Fig. 60).

10.3. Effets en présence de l'orthovanadate

L'incubation des bandelettes du côlon moyen avec le vanadate 1 mM, atteint par addition cumulée, convertit les CGs en contractions phasiques (Fig. 61). A 30 μM , la flavone ne modifie ni le tonus de repos, ni l'amplitude des contractions (Fig. 62). A 100 μM , le tonus de repos est significativement réduit ($49.5 \pm 7.19\%$, $n = 5$, $P \leq 0.05$) et l'amplitude des contractions reste inchangée ($P > 0.05$; Fig. 62).

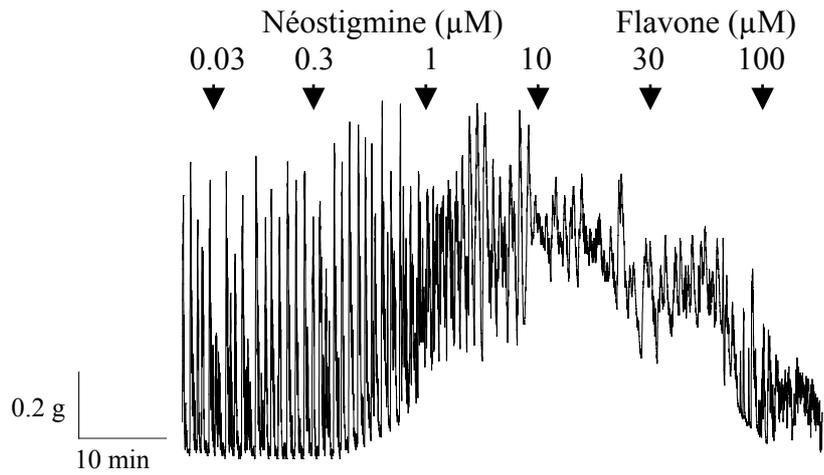


Figure 55. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée de la flavone sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de la néostigmine. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

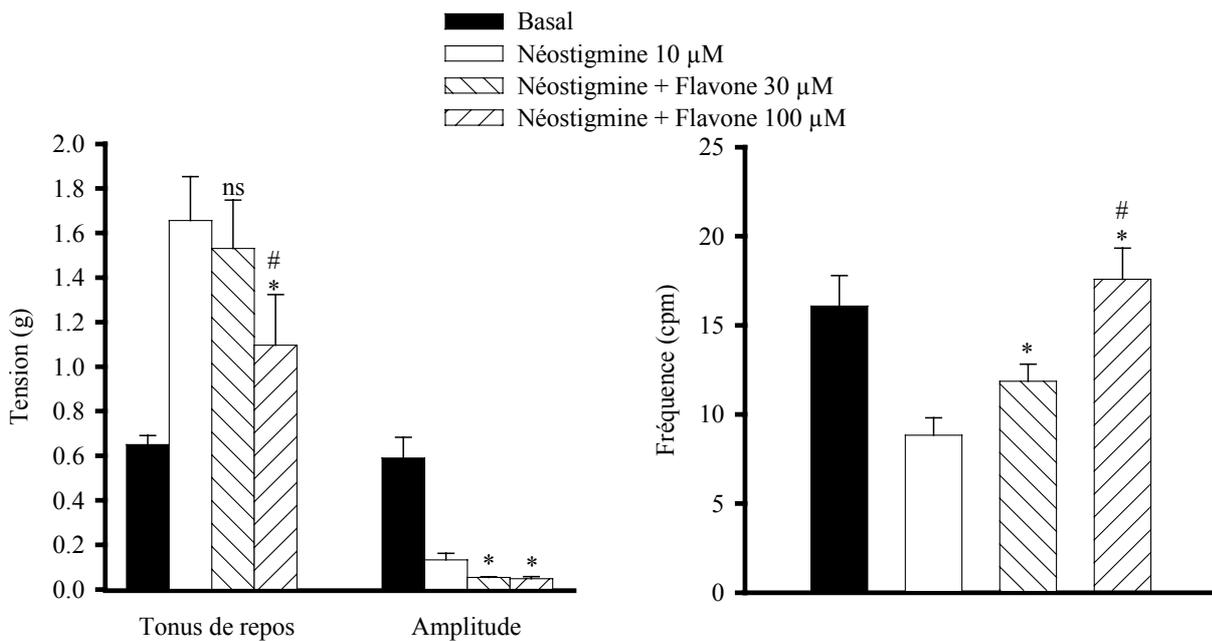


Figure 56. Effet de l'addition cumulée de la flavone sur le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen en présence de la néostigmine. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5). *: Comparaison par rapport à la néostigmine ($P \leq 0.05$). #: Comparaison par rapport à la flavone 30 µM.

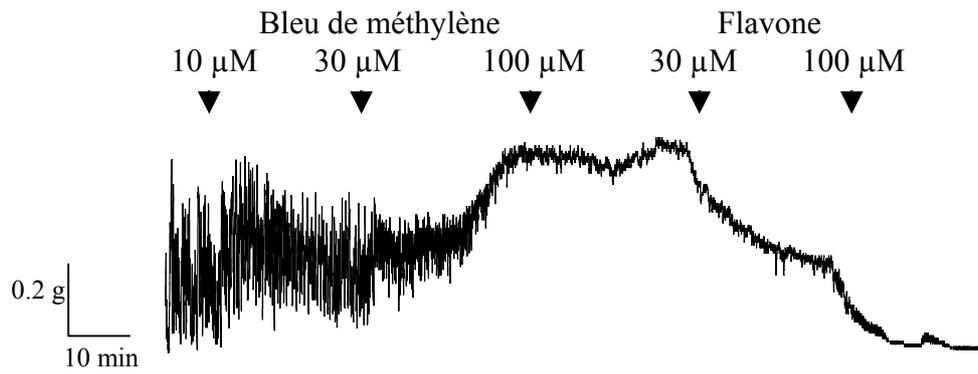


Figure 57. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée de la flavone sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence du bleu de méthylène. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

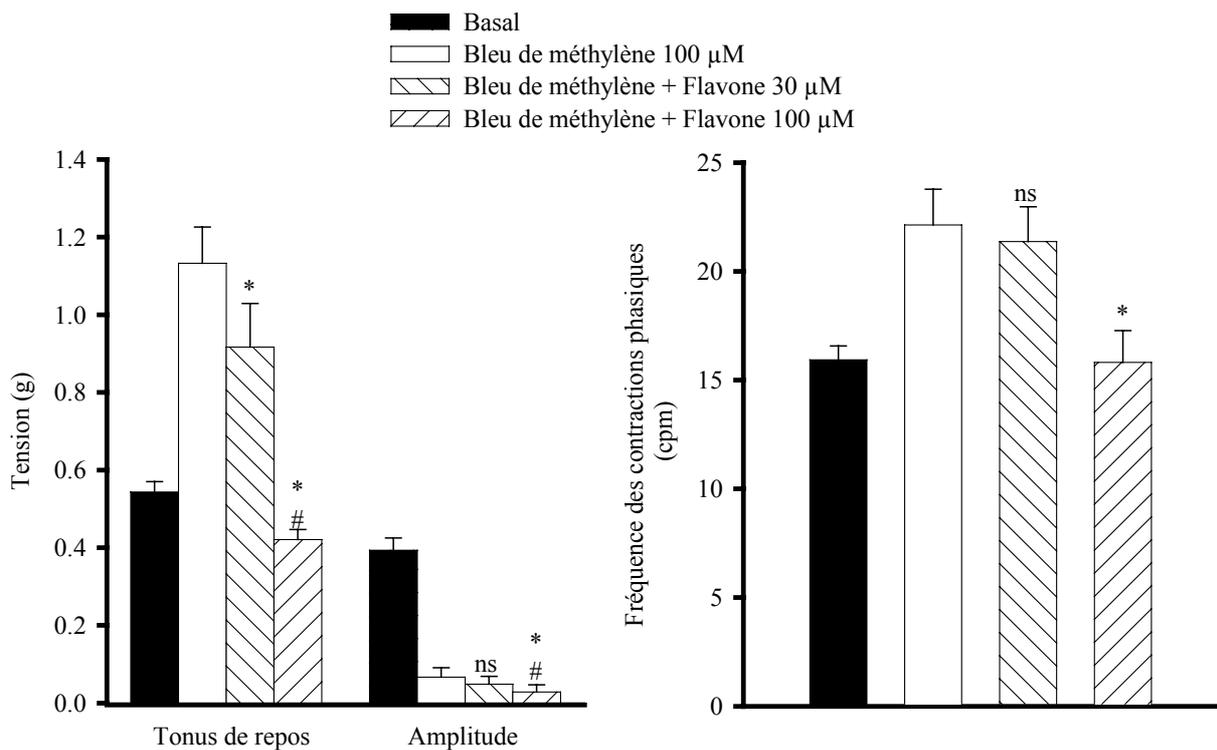


Figure 58. Effet de l'addition cumulée de la flavone sur le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen en présence du bleu de méthylène. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM ($n = 6$). *: Comparaison par rapport au bleu de méthylène ($P \leq 0.05$). #: Comparaison par rapport à la flavone 30 µM. ns : non significatif.

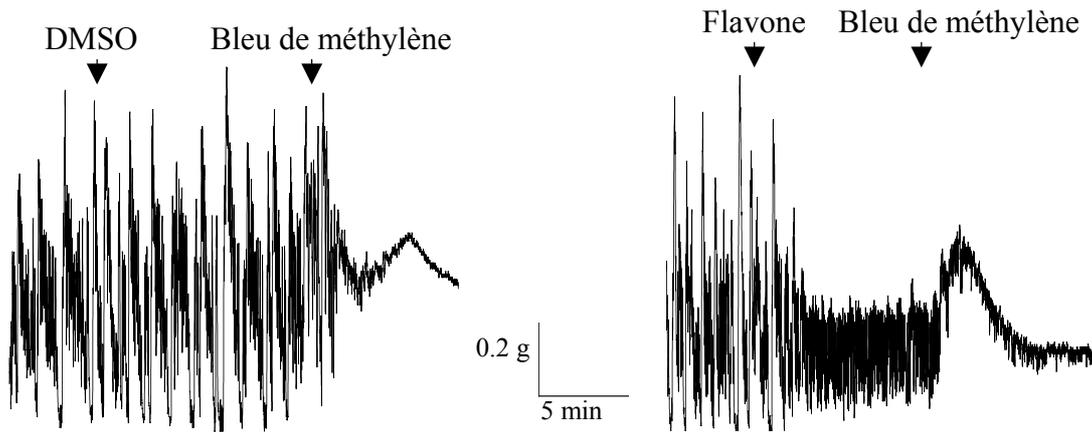


Figure 59. Enregistrements typiques de l'effet de bleu de méthylène 100 μ M sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence de DMSO et de la flavone 30 μ M. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

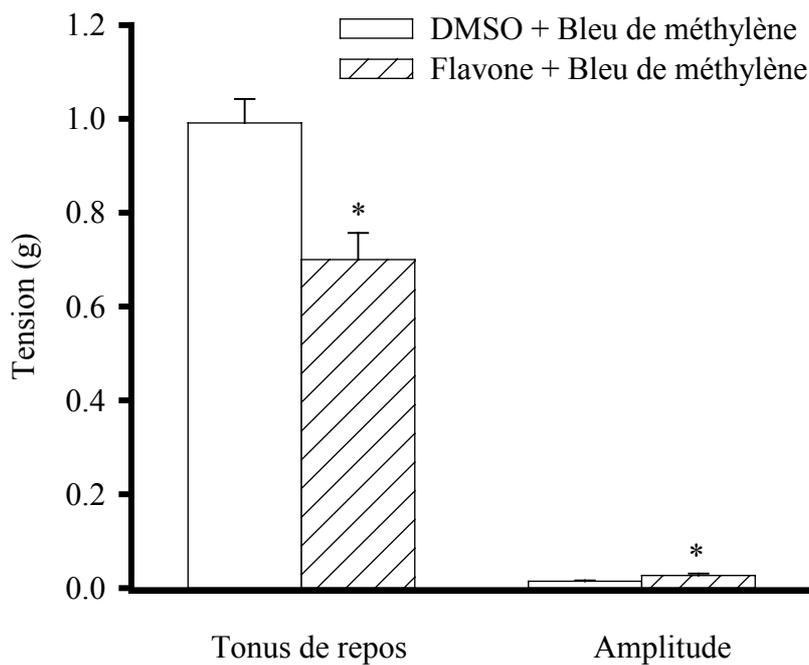


Figure 60. Effet de la flavone 30 μ M sur la réponse des bandelettes du côlon moyen au bleu de méthylène 100 μ M. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 6). *: Comparaison par rapport au DMSO + bleu de méthylène ($P \leq 0.05$), ns: $P > 0.05$.

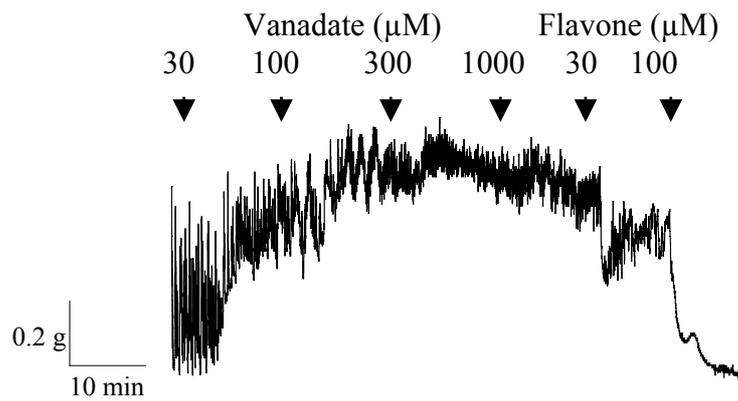


Figure 61. Enregistrement typique de l'effet de l'addition cumulée de la flavone sur la contraction des bandelettes du côlon moyen en présence du vanadate. La vitesse d'échantillonnage est de 2 Hz.

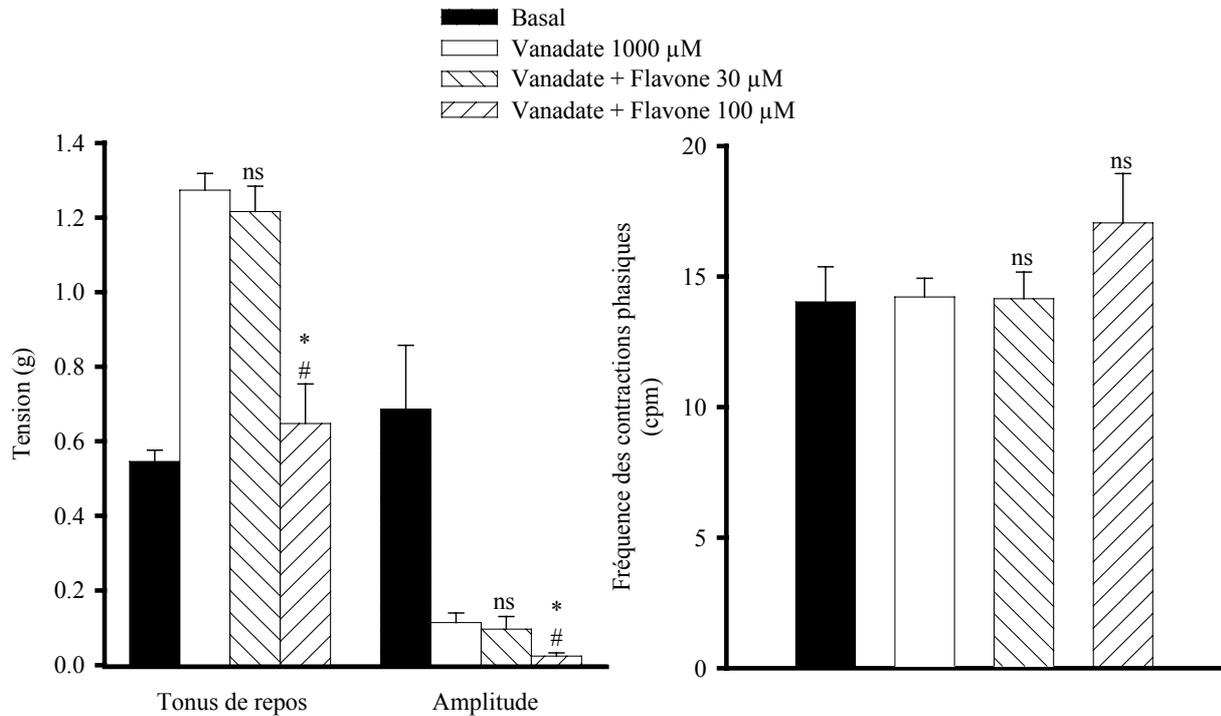


Figure 62. Effet de l'addition cumulée de la flavone sur le tonus de repos, l'amplitude et la fréquence des contractions phasiques des bandelettes du côlon moyen en présence du vanadate. Les valeurs sont la moyenne \pm SEM (n = 5). *: Comparaison par rapport au vanadate ($P \leq 0.05$). #: Comparaison par rapport à la flavone 30 μ M.

III. Discussion

1. La contraction musculaire spontanée

Le muscle lisse circulaire du côlon proximal, moyen et distal de lapin génère deux types d'activité mécanique spontanée: des contractions phasiques et des CGs, et qui sont observées sur des segments provenant du même animal. Cette activité contractile spontanée peut être attribuée à la tension initiale (1 g) appliquée au tissu au début de l'expérience. L'ouverture des canaux Ca^{2+} de type L par BAY-K-8640 augmente la fréquence et l'amplitude des CGs (Gonzalez et Sarna, 2001a), suggérant que la contraction rythmique spontanée pourrait être induite par l'étirement (étape essentielle de l'étude *in vitro*) qui ouvre ces canaux (Huizinga et al., 1985; Donnelly et al., 2001; Gonzalez et Sarna, 2001a). L'étirement pourrait donc déclencher un mécanisme cellulaire *in vitro* similaire à celui exercé *in vivo* par l'ACh pour stimuler les CGs (Donnelly et al., 2001; Gonzalez et Sarna, 2001a). Il a été remarqué dans la présente étude que la stimulation initiale avec le carbachol 1 μM favorise souvent l'apparition des CGs du côlon de lapin dans des fragments qui initialement ne présentaient pas ce type de contractions.

Les contractions phasiques, observées dans 35% des bandelettes, sont caractérisées par une petite amplitude et une fréquence élevée (14.7 ± 0.54 cpm); alors que les CGs, observées dans 65% des bandelettes, sont d'amplitude élevée (0.77 ± 0.03 g) et de faible fréquence (1.08 ± 0.01 cpm). Ces taux d'incidence sont proches de ceux rapportés pour le côlon distal du rat dans les conditions normales et les conditions NANC (Bayer et al., 2002). Une activité mécanique spontanée est également observée dans le côlon humain, de la souris et du porc aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Huizinga et al., 1983; Rae et al., 1998; Bush et al., 2000; Li et al., 2002). Les trois régions du côlon de lapin ne présentent pas de différences dans l'amplitude et la fréquence des contractions. Chez le rat, l'amplitude et la fréquence des CGs diminuent dans le sens aboral (Alberti et al., 2005) ou sont insignifiantes dans le côlon proximal et distal (Gonzalez et Sarna, 2001b). La fréquence des CGs ne semble pas beaucoup dépendre de l'espèce animal et fluctue entre 0.7 et 2.79 cpm (Huizinga et al., 1983; Rae et al., 1998; Bayer et al., 2002; Gallego et al., 2006; Alberti et al., 2007). Les CGs observées *in vitro* sont en fait le reflet statique des CGMs observées au niveau du côlon du rat et de la souris *in vivo*; la fréquence de ces dernières diminue dans le sens caudal (Bush et al., 2000; Li et al., 2002). Il semble que les contractions phasiques et les CGs ont des origines différentes. Les contractions phasiques sont absentes dans les bandelettes musculaires dont la muqueuse, la sous-muqueuse et la couche des ICCs sont enlevées (Durdle et al., 1983; Gonzalez et Sarna, 2001b). Par contre, les CGs ne sont pas altérées après l'élimination de ces couches, confirmant l'indépendance de cette activité des ICCs ou des ondes lentes (Gonzalez et Sarna, 2001b).

Le traitement des préparations musculaires des trois régions du côlon par le carbachol, agoniste muscarinique non sélectif, induit une réponse biphasique: une contraction phasique suivie d'une contraction tonique. L'amplitude de la contraction phasique dépend étroitement de la concentration. Une réponse similaire est observée aussi bien au niveau du côlon (Kobayashi et al., 2001; Takeuchi et al., 2001) qu'au niveau de l'iléon du rat (Espanol et Sales, 2000). La sensibilité du muscle lisse au carbachol, estimée par la mesure de la EC_{50} , est constante le long du côlon de lapin. Par contre, la contraction phasique est plus élevée dans le côlon proximal que dans le côlon distal. Cette différence de sensibilité est même observée avec des cellules isolées (absence d'influence neuro-humorale) du côlon proximal et du côlon distal de lapin (Carnicelli et al., 2000).

L'application de l'hexaméthonium 100 μ M, antagoniste des récepteurs ganglionnaires, aux préparations circulaires du côlon moyen ne modifie pas la fréquence et l'amplitude des CGs ni même le tonus basal, suggérant que les CGs du côlon ne sont pas contrôlés par les neurones ganglionnaires excitateurs (cholinergiques) et que cette activité cyclique régulière est plutôt d'origine myogène. Même au niveau du côlon du rat, l'amplitude, la fréquence des CGs et le tonus basal ne sont pas affectés par l'hexaméthonium (Börjesson et al., 1997; Gonzalez et Sarna, 2001b). Par contre, les CMMs observés au niveau du côlon de la souris sont dépendants de la neurotransmission cholinergique (Bush et al., 2000; Li et al., 2002).

Le traitement des bandelettes du côlon moyen avec l'atropine 1 μ M, concentration efficace pour le blocage de la réponse à l'ACh 30 μ M (Gonzalez et Sarna, 2001b), diminue légèrement le tonus de repos sans affecter l'amplitude et la fréquence des CGs. Cette insensibilité à l'atropine est généralisée au côlon du rat incubé dans des conditions normales (Gonzalez et Sarna, 2001a,b) et dans des conditions d'inhibition de l'influence adrénérgique par la guanéthidine (Bayer et al., 2002). La légère diminution du tonus de repos suggère une implication partielle possible des récepteurs muscariniques dans le maintien de ce tonus. L'absence d'effet de l'hexaméthonium et de l'atropine sur les CGs *in vitro* confirme bien leur origine myogène à la différence des CGMs, sensibles à l'hexaméthonium et à l'atropine (Li et al., 2002), qui sont d'origine neurogène.

L'inhibition réversible de l'acétylcholine estérase par la néostigmine augmente progressivement l'activité contractile du muscle lisse du côlon moyen d'une façon qui dépend de la concentration. Aux faibles concentrations de néostigmine, les CGs persistent, mais avec une amplitude plus élevée. A forte concentration, elles sont converties en contractions phasiques qui ressemblent à la contraction tonique induite par le carbachol. La néostigmine facilite la transmission cholinergique par inhibition de l'hydrolyse de l'ACh puisque la contraction induite par la néostigmine est sensible à l'atropine 1 μ M (résultats non présentés). Par inhibition de son hydrolyse, l'ACh libérée par les motoneurones excitateurs s'accumule au niveau des jonctions neuromusculaires puis diffuse et se fixe sur ses propres récepteurs (M_2 et M_3) situés sur la cellule musculaire pour induire la contraction

du tissu (Ward et al., 2000). L'augmentation du tonus de repos du côlon de lapin par la néostigmine rend compte de son activité pro-cinétique au niveau du côlon humain et de rat (Burleigh et al., 1984; Kishibayashi et Karasawa, 1995) et de sa capacité à restaurer l'activité péristaltique de l'iléon préalablement bloquée par la génistéine (Gharzouli et Holzer, 2004).

L'activation des récepteurs nicotiques par le DMPP 5 μ M induit une réponse biphasique sans affecter la fréquence des contractions. Durant les premières minutes (148 ± 41 s, n=8), l'activité mécanique spontanée du tissu est abolie sans changer le tonus de repos. Après cette période, le tissu reprend son activité spontanée mais avec un tonus de repos et une tension maximale plus faibles. Cet effet relaxant transitoire est également observé au niveau du côlon (proximal et distal) du cobaye, du rat et du chien (Maggi et al., 1985; Shuttleworth et al., 1995; Takeuchi et al., 1996). Le DMPP induit la relaxation non adrénérgique des segments longitudinaux du côlon distal de rat pré-contractés avec le carbachol 1 μ M (Börjesson et al., 1997). L'effet relaxant du DMPP est bloqué par l'apamine (blocage des canaux K_{ATP}), le réactif bleu (antagoniste des récepteurs P_{2y}) et le L-NNA, inhibiteur de la NOS (Börjesson et al., 1997). La nicotine induit la relaxation du muscle circulaire du côlon moyen de lapin (résultats non présentés) de la même manière que le DMPP. L'activité spontanée du muscle circulaire du côlon humain est également réduite par la nicotine; cet effet inhibiteur est bloqué par le L-NAME suggérant l'implication du NO dans le mécanisme de relaxation induite par la nicotine (Green et al., 2000; McKirdy et al., 2004). L'action du DMPP et de la nicotine suggèrent que les motoneurons entériques inhibiteurs contrôlent directement l'activité rythmique du côlon par la libération du NO et de l'ATP.

2. Rôle de la voie nitreurgique dans la contraction spontanée

L'incubation des préparations musculaires du côlon moyen avec le L-NAME, inhibiteur de la NOS, n'a aucun effet sur l'activité mécanique spontanée. L'absence d'effet sur les CGMs (*in vivo*) a été également observée au niveau du côlon moyen après administration intrapéritonéale du L-NAME 10 mg/kg (Li et al., 2002). Des différences régionales de sensibilité au NO ont été rapportées (Suthamnatpong et al., 1993a). De plus, des différences régionales dans l'innervation nitreurgique du côlon de rat doivent donc exister comme il a été montré auparavant (Takahashi et Owyang, 1998). Un effet significatif du L-NAME a été observé avec des bandelettes circulaires du côlon moyen du rat et non avec des bandelettes des régions proximale et distale, un effet expliqué par la richesse relative de cette région du tissu en cellules neuronales exprimant la NOS (Alberti et al., 2005). Par ailleurs, les inhibiteurs de la NOS se sont avérés efficaces pour augmenter le tonus basal, l'activité phasique et l'amplitude des contractions spontanées du côlon proximal (Mulè et al., 1999; Amato et al., 2005) et distal (Ciccocioppo et al., 1994; Bossone et al., 2001). La sensibilité du côlon du lapin au L-NAME est différente de celle des autres espèces. Il se peut que la concentration de L-NAME (100 μ M) utilisée dans la présente étude soit insuffisante pour bloquer l'activité de la

NOS. La L-arginine (substrat de la NOS) ne modifie ni le tonus de repos, ni la tension maximale des bandelettes du côlon moyen; mais elle prolonge la durée des CGs et diminue leur fréquence. Ce résultat suggère que l'apport de NO, formé à partir de la L-arginine, contrôle l'activité spontanée du côlon moyen de lapin. Une prolongation de la durée des contractions a été également observée avec des bandelettes longitudinales du côlon de souris (Powell et Bywater, 2003). Une preuve supplémentaire de l'implication du NO dans le contrôle des CGs est fournie par l'application du SNP. Le SNP réduit l'amplitude des CGs, leur fréquence et leur durée de manière dépendante de la concentration. La fréquence des CGMs du côlon sont réduites par le SNP chez le rat (Mulè et al., 1999; Plujà et al., 1999) et par le NOC-12 (donneur de NO) chez la souris (Tameyasu et al., 2004). Cependant, il semble que le côlon du rat est plus sensible au NO que celui du lapin car le SNP 10 μ M inhibe totalement les CGs chez le rat (Mulè et al., 1999) et partiellement (50%) celles mesurées chez le lapin.

Ces observations effectuées chez le lapin et celles accumulées avec l'application du L-NAME chez le rat (Mulè et al., 1999; Amato et al., 2005) révèlent que les CGs sont régulées par la libération tonique de NO. La libération basale de NO est responsable du mode oscillatoire de l'activité électrique et mécanique. La faible libération de NO devrait être capable de produire le comportement neurogène oscillatoire (Keef et al., 1997). Un rôle principal du NO est d'interagir avec la guanyl cyclase soluble pour l'activer (Denninger et Marletta, 1999). Plusieurs travaux s'accordent pour impliquer une activation de la guanyl cyclase par le NO dans le contrôle du rythme et de l'amplitude des contractions spontanées.

Pour tester l'implication du GMPc dans l'inhibition tonique par le NO, le bleu de méthylène est utilisé comme inhibiteur de la guanyl cyclase soluble (Börjesson et al., 1999). Le bleu de méthylène convertit les CGs en contractions phasiques et augmente le tonus de repos. La diminution de la concentration du GMPc est probablement responsable de l'augmentation du tonus de repos et du blocage de la phase de relaxation des CGs. L'activation directe de la guanyl cyclase par le composé YC-1 inhibe les contractions spontanées des bandelettes de l'utérus; cet effet est fortement réduit en présence du bleu de méthylène (Cetin et al., 2004). Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que le bleu de méthylène augmente le tonus et la force des contractions en empêchant le muscle lisse de générer des CGs. Un tonus élevé semble bloquer la génération des CGs comme il a été observé durant la contraction tonique des bandelettes induite par le carbachol ou la néostigmine.

La voie de la transmission nitroergique active la guanyl cyclase qui à son tour stimule l'ouverture des canaux K_{Ca} par l'intermédiaire de GMPc (Lu et al., 1998). Par ailleurs, l'excitabilité des cellules musculaires dépend étroitement de l'activité des canaux K_{ATP} (Langheinrich et Daut, 1997; Plujà et al., 1998).

3. Rôle des canaux K^+ dans la contraction spontanée

Le diazoxide, ouvreuse des canaux K_{ATP} , inhibe complètement toute activité mécanique du côlon moyen du lapin. Cependant, l'absence d'effet du diazoxide sur le tonus de repos suggère que ce dernier est indépendant de l'activité des canaux K_{ATP} . L'effet relaxant de plusieurs ouvreuses de canaux K_{ATP} (diazoxide, cromakalim, pinacidil, minoxidil) a été observé dans de nombreuses préparations de muscle lisse pré-contracté avec le KCl, l'ACh, la 5-HT et la prostaglandine $F2\alpha$ (Davies et al., 1996; Suzuki et al., 2001; Buharalioglu et Akar, 2002; Van Geldre et Lefebvre, 2004; Lebrun et al., 2008). Il a été montré que le pinacidil entraîne simultanément une hyperpolarisation des cellules du muscle lisse circulaire de l'iléon de la souris et une réduction de l'amplitude et de la durée des ondes lentes des ICCs (Kito et al., 2005). De la même manière, le pinacidil, le diazoxide et le lemakalim augmentent la probabilité d'ouverture des canaux K_{ATP} dans le côlon de souris (Koh et al., 1998), un effet qui rend compte de l'hyperpolarisation des cellules musculaires à cause de la sortie des ions K^+ .

L'inhibition non spécifique des canaux K^+ avec le TEA 5 mM induit deux types de réponses. Dans la plupart des cas, le TEA convertit les CGs en contractions phasiques. Dans d'autres cas, les CGs sont maintenues mais avec une augmentation de leur fréquence. Ceci suggère que les CGs du côlon de lapin sont contrôlées par au moins deux types de canaux K^+ , présentant chacun une sensibilité différente au TEA. La force de contraction et le tonus de repos des contractions phasiques des préparations longitudinales du duodénum de souris sont augmentés dans 75% des cas avec le TEA 2.5 mM (Dong et al., 2005). Deux types de canaux ont été identifiés dans l'iléon de souris et le côlon proximal de cobaye, l'un activé par le Ca^{2+} et inhibé par le TEA (2-5 mM) et l'autre insensible au Ca^{2+} et bloqué par le TEA >10 mM (Vogalis et Goyal, 1997; Vogalis et al., 1998). L'implication de ces deux types de canaux pourrait expliquer la généralisation de l'effet positif du TEA 5 mM sur les contractions phasiques du duodénum observée par Dong et ses collaborateurs (2005). Le TEA, en bloquant les canaux K^+ , induit une dépolarisation du potentiel de repos membranaire et augmente la durée de la dépolarisation au niveau des cellules musculaires isolées du côlon de chien et des cellules de muscle circulaire de l'iléon de cobaye (Post et Hume, 1992; Goyal et Xue, 1998). La dépolarisation prolongée est responsable de la contraction tonique induite par le TEA. Cependant, le caractère oscillatoire de l'activité mécanique spontanée nécessite donc un mécanisme de repolarisation de la membrane, les canaux Ca^{2+} sont candidats à travers leur interaction avec les canaux K^+ (Barajas-Lopez et Huizinga, 1988). En effet, le blocage des canaux Ca^{2+} de type L par le vérapamil inhibe totalement la contraction tonique induite par le TEA (Dong et al., 2005).

L'application du déqualinium comme bloqueur des canaux K_{Ca} sensibles à l'apamine convertit les CGs en contractions phasiques au niveau du côlon moyen du lapin. Cet effet contractile est

probablement dû à la dépolarisation induite par le blocage des canaux K_{Ca} (Goyal et Xue, 1998). L'augmentation du tonus de repos qui résulte de l'application du déqualinium confirme le rôle de ces canaux dans la repolarisation de la membrane et de la conduite des CGs. Le blocage plus spécifique des canaux K_{Ca} par l'apamine augmente l'amplitude et la fréquence des contractions rythmiques du muscle circulaire du côlon de lapin et de rat (Ciccocioppo et al., 1994; Plujà et al., 2000; Gonzalez et Sarna, 2001a).

4. Rôle de la phosphorylation des protéines intracellulaires

L'orthovanadate convertit les CGs du côlon moyen en contractions phasiques. Le tonus de repos est augmenté significativement d'une façon qui dépend de la concentration. L'effet contractile du vanadate sur le muscle lisse vasculaire et intestinal a été rapporté auparavant (Hudgins et Bond, 1981). Plusieurs travaux postérieurs ont confirmé l'induction de la contraction par le vanadate. En effet, le vanadate induit la contraction du muscle lisse de l'estomac (Petkov et Boev, 1996; Sim et Kim, 1998), de l'iléon (Candura et al., 1994; Mori et Tsushima, 2004), du côlon et du tænia coli (Willenbacher et al., 1992; Di Salvo et al., 1993). Il augmente d'une façon qui dépend de la concentration l'amplitude des contractions phasiques et induit une légère augmentation du tonus musculaire des segments de l'iléon de lapin (Candura et al., 1994). La contraction induite par le vanadate est indépendante de l'activation des récepteurs muscariniques, des récepteurs α -adrénergiques et de la libération des neurotransmetteurs du plexus myentérique (Alcon et al., 2000). La génistéine, inhibiteur des tyrosines kinases, bloque la contraction et la phosphorylation concomitante de la MLC induites par le vanadate au niveau du muscle lisse de l'iléon (Alcon et al., 2000; Mori et Tsushima, 2004). Le vanadate agit comme un inhibiteur des protéines tyrosine phosphatases qui antagonisent l'action des tyrosines kinases; la PP1c est en particulier la cible du vanadate au niveau des cellules musculaires lisses (Murthy, 2006). L'effet contractile du vanadate peut aussi être dû à une élévation du taux de Ca^{2+} intracellulaire à la suite de l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L et/ou de l'inhibition de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (Lynn et al., 1995; Kuriyama et al., 1998). En effet, la phosphorylation des canaux Ca^{2+} de type L par les protéines kinases augmente leur conductance, alors que la phosphorylation des pompes calciques bloque leur activité (Kuriyama et al., 1998). Dans certains muscles lisses, l'influx de Ca^{2+} à travers les canaux de type L stimule l'ouverture des récepteurs de la ryanodine, conduisant ainsi à l'amplification des signaux Ca^{2+} consécutifs à la dépolarisation (McGeown, 2004) comme la potentialisation de la force contractile (Ashcroft, 2000). La dépendance de l'effet du vanadate de l'ouverture des canaux Ca^{2+} est démontrée par la disparition de son effet contractile à la suite du blocage de ces canaux par la nifédipine (Candura et al., 1994).

Partant des diverses actions des substances pharmacologiques sur l'activité mécanique spontanée du côlon de lapin, un modèle du contrôle des CGs est présenté dans la figure 63. La stimulation des motoneurones entériques excitateurs libère les neurotransmetteurs excitateurs tel que l'ACh. L'ACh libérée dans la jonction neuromusculaire diffuse et se fixe sur ses récepteurs muscariniques situés à la surface de la cellule musculaire. L'activation de ces récepteurs, par l'ACh ou un agoniste muscarinique (carbachol) augmente la concentration du Ca^{2+} intracellulaire à la suite à l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et de la libération du Ca^{2+} par les réserves intracellulaires. L'effet de l'ACh libérée localement est potentialisé par la néostigmine et bloqué par l'atropine. L'augmentation de la concentration du Ca^{2+} conduit à la phosphorylation des chaînes légères de myosine, et par conséquent à la contraction du muscle. Le maintien de l'état phosphorylé de la Ca^{2+} -ATPase de la membrane plasmique et du réticulum sarcoplasmique, de la MLC_{20} et des canaux Ca^{2+} de type L par inhibition des phosphatases par le vanadate a pour effet de contracter le muscle lisse. En parallèle, la stimulation des motoneurones entériques inhibiteurs et l'activation des récepteurs nicotiques par le DMPP induisent la libération du NO synthétisé à partir de la L-arginine sous l'action de la NOS. Le NO libéré dans la jonction neuromusculaire et le NO exogène (SNP) diffusent vers la cellule musculaire et stimulent la guanyl cyclase soluble qui produit le GMPc. Ce dernier active les canaux K_{Ca} dont l'ouverture hyperpolarise la membrane plasmique et par conséquent relâche le muscle. L'inhibition de la NOS par le L-NAME et de la guanyl cyclase par le bleu de méthylène ainsi que le blocage des canaux K_{Ca} avec le TEA et le déqualinium s'opposent à l'effet myorelaxant du NO et du GMPc. Toutes ces activités dépendent de l'état d'ouverture des canaux K_{ATP} qui s'ouvrent et se ferment respectivement en réponse au diazoxide et au TEA. Une CG peut donc être considérée induite par l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants; la phase de relaxation est due à la libération tonique du NO qui induit l'ouverture des canaux K^{+} sensibles à l'apamine. Les contractions phasiques superposées à la CG sont probablement le reflet des "sparks" de Ca^{2+} juxtamembranaires découlant de l'activité des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants et des récepteurs de la ryanodine.

5. Effets de la flavone et de la quercétine sur les contractions géantes

L'incubation des préparations musculaires des trois régions du côlon avec la flavone et la quercétine diminue leur activité mécanique spontanée de manière qui dépend de la concentration. A l'inverse de la quercétine, la flavone réduit le tonus de repos du côlon proximal lorsque la concentration de 100 μM est atteinte; le côlon moyen et distal semblent plus sensibles à la flavone car le tonus est réduit à des concentrations plus faibles, 30 et 60 μM respectivement. A 100 μM , la flavone induit la disparition de toute activité mécanique. De même, l'amplitude et la fréquence des CGs sont réduites par la quercétine et la flavone, l'importance de l'effet dépend donc à la fois de la

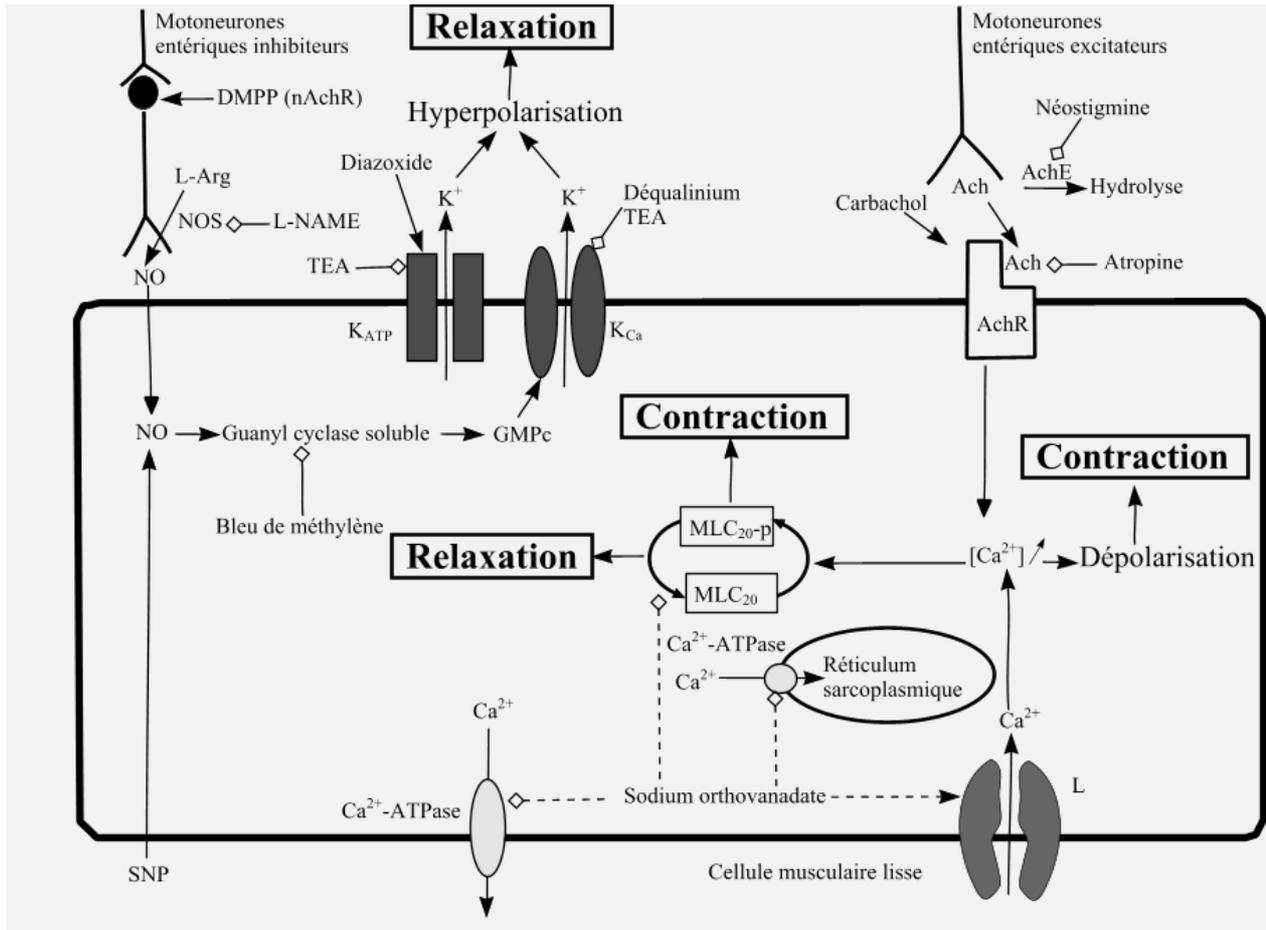


Figure 63. Modèle du contrôle des CGs du muscle lisse circulaire du côlon moyen de lapin. K_{ATP} : Canal K^+ sensible à l'ATP; K_{Ca} : Canal K^+ calcium-dépendant; ACh: Acétylcholine; AchE: Acétylcholine estérase; AchR: Récepteur de l'ACh; nAChR: Récepteur nicotinique; NOS: Oxyde nitrique synthase; MLC: Chaîne légère de myosine; L-Arg: L-arginine; L: Canal Ca^{2+} voltage-dépendant de type L. \longrightarrow : Activation; $--\blacktriangleright$: Activation indirecte; $\longleftarrow\blacklozenge$: Inhibition; $--\blacklozenge$: Inhibition indirecte. Voir le texte pour les détails.

région et de la concentration. A notre connaissance, il n'existe pas de travaux relatifs aux effets des flavonoïdes sur la motilité du côlon. Par contre, l'effet relaxant des flavonoïdes a été rapporté auparavant dans des préparations longitudinales de l'iléon et du jéjunum de plusieurs espèces animales (Van Den Broucke et Lemli, 1983; Abdalla et al., 1988, 1989; Hammad et Abdalla, 1997; Afifi et al., 1999). Il est devenu évident que l'effet myorelaxant des flavonoïdes s'exerce aussi bien sur le muscle lisse longitudinal de l'intestin que circulaire du côlon. Cet effet est généralisé aussi à d'autres types de muscles lisses comme l'utérus, la vessie, les artères et la trachée (Afifi et al., 1999; Dambros et al., 2005b; Leal et al., 2006; Morello et al., 2006).

La EC_{50} mesurée pour différents flavonoïdes révèle un large spectre de concentrations allant de 14.2 μ M (galangine) à 3.4 mM (flavanone) au niveau de l'iléon du rat (Hammad et Abdalla, 1997). La relaxation du côlon du lapin induite par la flavone est plus importante que celle induite par la quercétine 100 μ M. Cependant, il a été rapporté que la EC_{50} de la quercétine est d'environ 2.7 fois plus importante que celle de la flavone au niveau de l'iléon du rat (Hammad et Abdalla, 1997). Dans notre expérience, l'importance relative de l'effet de la flavone peut être due à sa grande perméabilité à travers la membrane (Tammela et al., 2004); une fois à l'intérieur de la cellule, elle pourrait agir sur l'appareil contractile et/ou influencer les mécanismes membranaires responsables de l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire. L'administration intra-péritonéale de certains flavonoïdes (apigénine, flavone, kampférol, morine, myricétine et naringine) réduit significativement le transit intestinal chez la souris (Di Carlo et al., 1993), un effet qui peut être expliqué par la forte inhibition du péristaltisme observée au niveau de l'iléon du cobaye *in vitro* (Gharzouli et Holzer, 2004).

L'inhibition de l'activité contractile par les flavonoïdes peut être due à une interférence notable avec la mobilisation du Ca^{2+} et/ou à une diminution de l'excitabilité du muscle lisse ou carrément à une altération au niveau de l'appareil contractile.

La contraction musculaire est un mouvement qui nécessite un taux élevé de Ca^{2+} intracellulaire (entrée du Ca^{2+} extracellulaire, libération des réserves intracellulaires). Les flavonoïdes et parmi eux la quercétine et la flavone pourraient empêcher l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire et/ou sa libération des réserves intracellulaires. De nombreux travaux s'accordent sur l'hypothèse de la mobilisation du Ca^{2+} dans l'inhibition de la contraction spontanée et stimulée du muscle lisse par les flavonoïdes (Reuelta et al., 1997; Summanen et al., 2001; Dambros et al., 2005a,b). L'effet antagoniste de la quercétine sur le Ca^{2+} est démontré par le déplacement à droite de la courbe dose-réponse de la contraction induite par le Ca^{2+} au niveau de l'iléon (Morales et al., 1994). Le blocage des canaux calciques par le vérapamil inhibe partiellement l'effet relaxant de la galangine sur le muscle détrusor (Dambros et al., 2005b), suggérant que la galangine inhibe l'influx du Ca^{2+} et module son mouvement à l'intérieur de la cellule. Il a été aussi montré que diverses flavones, la naringénine et les isoflavones (20 μ g/ml) inhibent l'entrée du $^{45}Ca^{2+}$ à travers les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants

dans les cellules hypophysaires GH₄C₁ de rat. Paradoxalement, les flavonols (quercétine et morine) stimulent l'entrée du Ca²⁺ (Summanen et al., 2001). De plus, la pré-incubation des artères pulmonaires, de la trachée, de l'iléon ou des anneaux aortiques avec l'hispiduline, la flavone ou la fisétine réduit significativement la contraction induite par le CaCl₂ ou la phényléphrine dans un milieu dépourvu de Ca²⁺; ce qui montre que l'effet myorelaxant des flavonoïdes implique l'inhibition de la libération du Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique (Abdalla et al., 1988; Ajay et al., 2003). Un effet stimulateur de la quercétine est au contraire observé dans les mêmes conditions (Ajay et al., 2003), un effet expliqué par la stimulation de l'entrée du Ca²⁺.

Les voies de signalisation situées en aval du Ca²⁺ peuvent être la cible des flavonoïdes, en particulier ceux qui ont une grande capacité à traverser la membrane cellulaire. La contraction de l'aorte induite par le phorbol 12-myristate-13-acétate, activateur de la PKC, est inhibée par plusieurs flavonoïdes (flavonols, flavanones, génistéine) (Herrera et al., 1996). De même, la quercétine est considérée comme un inhibiteur de la MLCK (Sohn et al., 2001). L'élévation du taux d'AMPc et de GMPc par inhibition des phosphodiésterases est également un facteur qui stimule la relaxation du muscle lisse. En effet, la 3-O-méthylquercétine inhibe la phosphodiésterase AMPc- et GMPc-dépendante (Ko et al., 2002).

6. Effets de la flavone et de la quercétine sur la contraction stimulée

Le carbachol induit une contraction biphasique représentée par une contraction phasique et une contraction tonique. La contraction phasique est due à la libération du Ca²⁺ intracellulaire, tandis que la contraction tonique est due à l'entrée du Ca²⁺ extracellulaire (Takeuchi et al., 2001; McCarron et al., 2002). L'épuisement des réserves du Ca²⁺ par la caféine, après élimination du Ca²⁺ extracellulaire ou le blocage des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants par addition de la nifédipine, supprime complètement la réponse contractile des cellules musculaires lisses au carbachol (Oh et al., 1997). La légère diminution de la contraction du côlon proximal induite par la thapsigargine, inhibiteur de la Ca²⁺-ATPase du réticulum sarcoplasmique, suggère que le Ca²⁺ entrant à travers les canaux Ca²⁺ voltage-dépendants et non le Ca²⁺ libéré du réticulum sarcoplasmique est essentiel pour la contraction induite par le carbachol (Takeuchi et al., 2001). La contraction tonique du muscle lisse du côlon distal est abolie lorsque le tissu est incubé dans un milieu physiologique dépourvu de Ca²⁺, elle est bloquée par les antagonistes des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants (nimodipine, nifédipine et nicardipine) (Takeuchi et al., 2001; Buharalioglu et Akar, 2002; McCarron et al., 2002).

La flavone et la quercétine réduisent la contraction tonique du côlon du lapin induite par le carbachol d'une manière dépendante de la concentration et du flavonoïde testé. La flavone est également capable de réduire la contraction tonique du côlon induite par la néostigmine. Plusieurs flavones méthoxylés (lutéoline, apigénine, thymonine, 8-méthoxycirsilineol, xanthomicrol),

l'hispiduline ainsi que la diméthoxyquercétine inhibent la contraction de l'iléon du cobaye induite par le carbachol et l'ACh et déplacent la courbe concentration-réponse vers la droite (diminution de la EC_{50}) (Van Den Broucke et Lemli, 1983; Abdalla et al., 1988, 1989; Ajay et al., 2003). Un effet myorelaxant de divers flavonoïdes, comme la triméthoxyflavone, l'apigénine et la galangine, a été également observé dans la trachée (Leal et al., 2006), l'aorte (Zhang et al., 2002; Ajay et al., 2003) et la vessie (Capasso et Tavares, 2002). Etant donné que la contraction tonique est due à l'entrée du Ca^{2+} extracellulaire, il est possible que la flavone et la quercétine interviennent à ce niveau. L'activité phasique de l'intestin est en partie contrôlée par le caractère oscillatoire de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} (Sgaragli et al., 1993). En effet, le blocage des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de l'iléon et du côlon de lapin par le vérapamil (résultats non présentés) et la nifédipine (Grasa et al., 2004) abolit l'activité phasique et réduit le tonus des contractions spontanées.

L'incubation des préparations musculaires du côlon moyen en présence du KCl 80 mM induit une contraction biphasique: contraction phasique suivie d'une contraction tonique. La contraction induite par le KCl est due à la dépolarisation de la membrane plasmique et à l'activation des canaux Ca^{2+} -voltage-dépendants, ce qui augmente l'influx du Ca^{2+} à travers ces canaux (Barone et al., 1986; Buharalioglu et Akar, 2002; Grasa et al., 2004). En effet, le blocage des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants par le vérapamil et la nifédipine inhibe la contraction du muscle lisse du côlon, de l'iléon et du fundus induite par le KCl 60 mM (Barone et al., 1986; Buharalioglu et Akar, 2002; Grasa et al., 2004). En milieu dépolarisant, le Ca^{2+} entraîne la contraction de l'iléon, de l'utérus et de l'aorte de manière dépendante de la concentration (Sgaragli et al., 1993; Revuelta et al., 1997; Uydes-Dogan et al., 2005).

La flavone et la quercétine réduisent la contraction tonique induite par le KCl 80 mM de façon dépendante de la concentration. L'inhibition est significative à partir de 1 μ M pour la flavone et de 10 μ M pour la quercétine. Un effet relaxant de la quercétine et des flavones (hydroxylés et méthoxylés) a été également rapporté sur la contraction de l'iléon, de l'aorte, de l'utérus et de la trachée induite par le KCl ou le $CaCl_2$ en milieu dépolarisant (Van Den Broucke et Lemli, 1983; Duarte et al., 1993; Morales et al., 1994; Revuelta et al., 1997; Uydes-Dogan et al., 2005; Leal et al., 2006).

La diversité dans les flavonoïdes qui relâchent le muscle pré-contracté (KCl et carbachol) ainsi que la diversité des tissus affectés par ces molécules laissent supposer l'existence d'un mécanisme d'action commun. Un des mécanismes d'action est une altération du couplage excitation-contraction et une inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. Du fait que la contraction induite par le KCl est due à la pénétration du Ca^{2+} extracellulaire, l'effet inhibiteur de la flavone et de la quercétine peut être attribué partiellement au blocage de l'entrée du Ca^{2+} à travers les canaux Ca^{2+}

voltage-dépendants. L'hispiduline, la quercétine, la génistéine et le kampférol inhibent la contraction de l'iléon, de l'aorte, de la trachée et de l'utérus induite par le CaCl_2 dans un milieu dépolarisant, en déplaçant la courbe concentration-réponse vers la droite (Abdalla et al., 1988; Morales et al., 1994; Revuelta et al., 1997).

7. Interférence de la flavone avec la voie nitrergique

L'addition de la flavone 30 μM en présence du L-NAME réduit uniquement la fréquence des CGs, le tonus de repos et l'amplitude des contractions restent inchangés. La flavone seule réduit à la fois la fréquence et l'amplitude des contractions. Ces résultats combinés suggèrent que la flavone agirait sur les canaux Ca^{2+} -voltage dépendants (régulant l'amplitude) et les canaux K^+ (régulant la fréquence). L'activité des canaux K^+ dépendants du Ca^{2+} est modulée par le NO (Lemos et al., 1999). La relaxation induite par la flavone est résistante à l'application du L-NAME dans le cas de l'aorte pré-contractée avec la phényléphrine; ce qui n'est pas le cas avec la quercétine, la naringénine et la fisétine (Ajay et al., 2003). La relaxation induite par la diocléine (5,2',5'-trihydroxy-6-7-diméthoxyflavanone), la flavone à faible concentration et les dérivés méthoxylés de la flavone (salvigénine, 6-hydroxylutéoline 6,7,3',4'-tétraméthyléther, isokampféride) est inhibée par l'inhibition de la NOS (Lemos et al., 1999; Ajay et al., 2003; Uydes-Dogan et al., 2005; Leal et al., 2006). L'addition de la flavone 30 μM à des préparations du côlon moyen prétraitées avec le SNP empêche la reprise de l'activité contractile normalement développée par les bandelettes témoins (SNP + DMSO). La flavone semble donc prolonger l'effet du SNP mais sans le modifier. Ces résultats combinés suggèrent que les flavonoïdes et en particulier la flavone et ses dérivés méthoxylés mettent en jeu la voie de signalisation NO-GMPc responsable de la relaxation du muscle lisse (Ruth, 1999).

L'inhibition de la guanyl cyclase par le bleu de méthylène après prétraitement du côlon de lapin avec la flavone induit une élévation du tonus mais à un niveau inférieur à celui noté dans le tissu témoin, suggérant une activation possible de la guanyl cyclase par la flavone. Il a été montré que l'apigénine, une flavone, induit une augmentation du taux de GMPc dans les anneaux intacts de l'aorte, un effet qui est aboli par le prétraitement avec le L-NAME (Zhang et al., 2002). L'inhibition de la guanyl cyclase soluble par l'ODQ ou le bleu de méthylène réduit la relaxation de la trachée et de l'aorte induite respectivement par l'isokampféride (Leal et al., 2006) ou les procyanidines (Kim et al., 2000). Cependant, cette voie ne semble pas être l'unique voie de la relaxation induite par la flavone dans le côlon de lapin puisque la flavone continue à relâcher le muscle pré-contracté avec le bleu de méthylène.

8. Effets de la quercétine et de la flavone en présence des modulateurs pharmacologiques des canaux K^+

Lorsque les CGs sont converties en contractions phasiques par le TEA 5 mM, l'application de la flavone ou de la quercétine 30 μM ne modifie pas le seuil atteint par les contractions phasiques. Ceci suggère que l'effet myorelaxant habituel de ces deux flavonoïdes fait intervenir l'ouverture de certains types de canaux K^+ insensibles au TEA (canaux K_v rapide) (Vogalis, 2000). Par ailleurs, l'application du déqualinium 10 μM pour inhiber spécifiquement les canaux K^+ sensibles à l'apamine révèle que la flavone et la quercétine convertissent la contraction phasique induite par le déqualinium en CGs bien que ces dernières soient réduites en amplitude et en fréquence. La reprise de ce type d'activité suggère donc que la flavone et la quercétine sont capables d'ouvrir des canaux autres que les canaux K_{Ca} -sensibles à l'apamine. Les canaux candidats sont les canaux BK (Imai et al., 2001). Le fait que les CGs sont affectées par rapport aux conditions normales, il est possible que ces flavonoïdes continuent à interférer avec la mobilisation du Ca^{2+} . Il a été rapporté que la vasorelaxation induite principalement par les flavones et les flavanones met en jeu les canaux K^+ sensibles au TEA, les canaux BK et les canaux K_{ATP} . En particulier, la lutéoline et la 5-hydroxyflavone semblent posséder un mécanisme d'action de vasorelaxation qui met en jeu au moins les canaux BK et les canaux K_{ATP} (Calderone et al., 2004). D'autres études ont montré que d'autres flavonoïdes, le kampférol, l'isokampféride et l'apigénine sont capables d'ouvrir les canaux BK (Li et al., 1997; Leal et al., 2006), ce qui explique leur effet myorelaxant (Van Den Broucke et Lemli, 1983; Revuelta et al., 1997; Calderone et al., 2004; Gharzouli et Holzer, 2004; Leal et al., 2006).

L'ouverture des canaux K_{ATP} par le diazoxide hyperpolarise le muscle lisse (Koh et al., 1998) et par conséquent bloque toute activité contractile myogène. Lorsque la flavone est appliquée aux bandelettes du côlon après l'ouverture des canaux K_{ATP} par le diazoxide, il s'ensuit une élévation du tonus de repos et l'apparition d'une activité phasique de faible amplitude en général. Par contre, cet effet n'est pas observé avec la quercétine. La flavone se caractérise par un coefficient de perméabilité très élevé comparé à d'autres flavonoïdes (Tammela et al., 2004). Cette propriété peut être à l'origine d'une forte accumulation de la flavone dans les cellules ou dans la membrane plasmique, ce qui facilite l'accès de la molécule aux canaux K_{ATP} . Une hypothèse de travail qui explique une élévation du tonus induit par la flavone consiste à supposer une interaction entre la flavone et le canal. Par contre, les canaux K_{ATP} semblent être impliqués dans la vasorelaxation induite par la lutéoline et la 5-hydroxyflavone (Calderone et al., 2004).

9. Interférence de la flavone avec le vanadate

L'application du vanadate entraîne une élévation du tonus de repos où des contractions phasiques de faible amplitude prennent la place des CGs. Il est généralement admis que cette contraction est due essentiellement à l'inhibition des protéines tyrosine phosphatases (Di Salvo et al., 1993; Mori et Tsushima, 2004), impliquant donc le rôle des tyrosines kinases dans la contraction du muscle lisse. La flavone 100 μ M relâche le côlon pré-contracté par le vanadate, suggérant que la flavone agirait comme un inhibiteur des tyrosines kinases. Un effet similaire a été rapporté pour la génistéine (isoflavonoïde) (Di Salvo et al., 1993; Alcon et al., 2000; Mori et Tsushima, 2004; Grasa et al., 2006), qui est couramment utilisée comme un inhibiteur de référence des tyrosines kinases en interagissant avec le site de fixation de l'ATP (Alcon et al., 2000).

Du fait que le vanadate induit la contraction du muscle lisse par augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire à la suite de l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L et/ou de l'inhibition de la Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarco-endoplasmique (Lynn et al., 1995; Kuriyama et al., 1998), il est possible que l'effet myorelaxant de la flavone soit aussi dû au blocage de ce type de canaux. La contraction induite par le vanadate ferait intervenir un mécanisme de signalisation calcium-dépendant puisque la chélation du Ca^{2+} extracellulaire par l'EGTA entraîne la relaxation du tænia coli du cobaye (Di Salvo et al., 1993). L'activation des canaux Ca^{2+} de type L par l'intermédiaire des récepteurs muscariniques dans le côlon met en jeu l'activation de la tyrosine kinase dont le rôle est de phosphoryler ce canal pour augmenter leur probabilité d'ouverture après la séquestration du Ca^{2+} intracellulaire (Jin et al., 2002). Ceci suggère que la flavone peut aussi interférer avec l'état d'ouverture des canaux calciques.

Conclusions et perspectives

L'activité mécanique spontanée du côlon proximal, moyen et distal de lapin est étudiée *in vitro* sur des bandelettes du muscle lisse circulaire. Ces dernières génèrent une activité spontanée reproductible et identique dans les trois régions sous forme de contractions phasiques ou de CGs. La contraction phasique des bandelettes des trois régions du côlon induite par le carbachol (10^{-9} - 10^{-4} M) est indépendante de la région du côlon étudiée mais dépend de la concentration. La néostigmine est capable de convertir les CGs en contractions phasiques avec une augmentation du tonus de repos. L'atropine 1 μ M et l'hexaméthonium 100 μ M n'ont pas d'effet sur les CGs du côlon moyen, confirmant ainsi l'origine myogène de ces contractions. Le DMPP 5 μ M entraîne une relaxation du muscle lisse seulement pendant les premières minutes de son application. Le blocage spécifique ou non spécifique des canaux K^+ respectivement par le déqualinium 10 μ M ou le TEA 5 mM convertit les CGs en contractions phasiques avec augmentation du tonus de repos. Cet effet contractile est dû à la dépolarisation des cellules musculaires. Par contre, le diazoxide 100 μ M en ouvrant les canaux K_{ATP} inhibe toute activité spontanée du muscle lisse probablement à la suite de l'hyperpolarisation des cellules musculaires. Le contrôle des CGs par le NO est révélé par la diminution progressive de l'activité contractile par le SNP ainsi que l'allongement de la durée des CGs par la L-arginine 4 mM. L'implication du GMPc dans l'inhibition induite par le NO est confirmée par la conversion des CGs en contractions phasiques induite par le bleu de méthylène. Le maintien de l'état de phosphorylation de la MLC par la MLCK et d'autres protéines intracellulaires par des kinases est essentiel pour générer des contractions soutenues; l'orthovanadate en inhibant les tyrosines phosphatases stimule la contraction du muscle lisse circulaire.

La flavone et la quercétine diminuent l'activité contractile spontanée des bandelettes des trois régions du côlon de façon qui dépend de la concentration. L'influence de ces deux molécules sur les mouvements du Ca^{2+} lors de la contraction s'explique par leur capacité à inhiber la contraction induite par le carbachol et le KCl. Ces résultats confirment ceux qui sont rapportés par plusieurs auteurs et confirment que l'effet inhibiteur de ces flavonoïdes peut être généralisé à l'ensemble des divers types de muscle lisse. L'effet myorelaxant de la flavone et de la quercétine semble faire intervenir des canaux K^+ insensibles au TEA et des canaux autres que les canaux K_{Ca} sensibles à l'apamine du fait que ces flavonoïdes ne modifient pas le seuil atteint par les contractions phasiques en présence du TEA et réduisent la contraction tonique induite par le déqualinium. La flavone continue à relâcher le muscle pré-contracté avec le bleu de méthylène, la néostigmine, et le vanadate indiquant que la voie nitreurgique et le blocage des canaux Ca^{2+} ne semblent pas être les seules voies de la relaxation induite par la flavone.

Les divers aspects abordés dans cette étude ouvrent de nouvelles perspectives de recherche. Du fait que plusieurs études antérieures montrent que l'effet myorelaxant des flavonoïdes dépend de leur structure chimique, il est intéressant d'aborder la relation structure-activité de divers flavonoïdes au niveau du côlon. Les mécanismes de la relaxation du muscle lisse cités dans la littérature impliquent l'activation de la voie nitreurgique, l'ouverture des canaux K^+ et le blocage des canaux Ca^{2+} . Ces trois voies méritent une attention particulière avec d'autres molécules substituées en partant du squelette flavone pour rechercher d'éventuelles molécules capables d'agir spécifiquement sur un mécanisme particulier.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Abdalla S., bu-Zarga M., Afifi F., Al-Khalil S., and Sabri S. Effects of hispidulin, a flavone isolated from *Inula viscosa*, on isolated guinea-pig smooth muscle. *Gen Pharmacol* 1988; 19: 559-563.
- Abdalla S., Zarga M. A., Afifi F., Al-Khalil S., Mahasneh A., and Sabri S. Effects of 3,3'-di-O-methylquercetin on guinea-pig isolated smooth muscle. *J Pharm Pharmacol* 1989; 41: 138-141.
- Abdel-Latif A. A. Cross talk between cyclic nucleotides and phosphoinositides hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med* 2001; 226: 153-163.
- Afifi F. U., Khalil E., and Abdalla S. Effect of isoorientin isolated from *Arum palaestinum* on uterine smooth muscle of rats and guinea pigs. *J Ethnopharmacol* 1999; 65: 173-177.
- Agullo G., Gamet-Payrastre L., Manenti S., Viala C., Rémésy C., Chap H., and Payrastre B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: A comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1649-1657.
- Ajay M., Gilani A. U., and Mustafa M. R. Effects of flavonoids on vascular smooth muscle of the isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2003; 74: 603-612.
- Akbarali H. I., Pothoulakis C., and Castagliuolo I. Altered ion channel activity in murine colonic smooth muscle myocytes in an experimental colitis model. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 637-642.
- Al-Jarallah A., Khan I., and Oriowo M. A. Role of Ca²⁺-sensitization in attenuated carbachol-induced contraction of the colon in a rat model of colitis. *Eur J Pharmacol* 2008; 579: 365-373.
- Alberti E., Mikkelsen H. B., Larsen J. O., and Jiménez 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.
- Alberti E., Mikkelsen H. B., Wang X. Y., Diaz M., Larsen J. O., Huizinga J. D., and Jiménez M. Pacemaker activity and inhibitory neurotransmission in the colon Ws/Ws mutant rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G1499-G1510.
- 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.
- 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 gallbladder. *J Physiol* 2001a; 532: 793-810.
- Alcon S., Morales S., Camello P. J., Salido G. M., Miller S. M., and Pozo M. J. Relaxation of canine gallbladder to nerve stimulation involves adrenergic and non-adrenergic non-cholinergic mechanisms. *Neurogastroenterol Motil* 2001b; 13: 555-566.
- Almeida R. R., Raimundo J. M., Oliveira R. R., Kaplan M. A. C., Gattass C. R., Sudo R. T., and Sudo G. Z. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33: 109-113.
- Altschuler S. M., Escardo J., Lynn R. B., and Miselis R. R. The central organisation of the vagus nerve innervating the colon of the rat. *Gastroenterology* 1993; 104: 502-509.
- Amato A., Corti A., Serio R., and Mulè F. Inhibitory influence of chromogranin A N-terminal fragment (vasostatin-1) on the spontaneous contractions of rat proximal colon. *Regul Pept* 2005; 130: 42-47.
- Amos S., Okwuasaba F. K., Gamaniel K., Akah P., and Wambebe C. Inhibitory effects of the aqueous extract of *Pavetta crassipes* leaves on gastrointestinal and uterine smooth muscle preparations isolated from rabbits, guinea pigs and rats. *J Ethnopharmacol* 1998; 61: 209-213.
- Ashcroft FM. Voltage-gated K⁺ channels. In: Ion channels and disease, edited by Ashcroft F.M. USA: 2000, p. 97-124.
- Atta A. H., and Mouneir S. M. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol* 2004; 92: 303-309.
- Ausina P., Savineau J. P., Pinto F. M., Martin J. D., and Candenas L. Ca²⁺-independent contraction induced by hyperosmolar K⁺-rich solutions in rat uterus. *Eur J Pharmacol* 1996; 312: 309-318.
- 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.
- Barajas-Lopez C., and Huizinga J. D. Heterogeneity in spontaneous and tetraethylammonium induced intracellular electrical activity in colonic circular muscle. *Pflugers Arch* 1988; 412: 203-210.

- Barajas-Lopez C., Den H. A., and Huizinga J. D. Ionic basis of pacemaker generation in dog colonic smooth muscle. *J Physiol* 1989; 416: 385-402.
- Barađano D. E., and Snyder S. H. Neural roles for heme oxygenase: Contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Nat Acad Soc U. S. A* 2001; 98: 10996-11002.
- Barocelli E., Ballabeni V., Chiavarini M., Caretta A., Molina E., and Impicciatore M. Regional differences in motor responsiveness to antimuscarinic drugs in rabbit isolated small and large intestine. *Pharmacol Res* 1995; 31: 43-48.
- Baron R., Janig W., and McLachlan E. M. The afferent and sympathetic components of the lumbar spinal outflow to the colon and pelvic organs in the cat. I. The hypogastric nerve. *J Comp Neurol* 1985; 238: 135-146.
- Barone F. C., White R. F., Ormsbee H. S., III, and Wasserman M. A. Effects of calcium channel entry blockers, nifedipine and nilvadipine, on colonic motor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 237: 99-106.
- Bayer S., Crenner F., Aunis D., and Angel F. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon. *Life Sci* 2002; 71: 911-925.
- Becker B., Antoine M. H., Nguyen Q. A., Rigo B., Cosgrove K. E., Barnes P. D., Dunne M. J., Pirotte B., and Lebrun P. Synthesis and characterization of a quinolinonic compound activating ATP-sensitive K⁺ channels in endocrine and smooth muscle tissues. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 375-385.
- Benavente-Garcia O., Castillo J., Marin F. R., Ortuno A., and Del Rio J. A. Uses and properties of Citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 4505-4515.
- Bennett A., Eley K. G., and Stockley H. L. Inhibition of peristalsis in guinea-pig isolated ileum and colon by drugs that block prostaglandin synthesis. *Br J Pharmacol* 1976; 57: 335-340.
- Bezprozvanny I., Watras J., and Ehrlich B. E. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃ and calcium-gated channels from sarcoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 1991; 351: 751-754.
- Bielefeld D. R., Hume J. R., and Krier J. Action potentials and membrane currents of isolated single smooth muscle cells of cat and rabbit colon. *Pflugers Arch* 1990; 415: 678-687.
- Boeckstaens G. E. Understanding and controlling the enteric nervous system. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2002; 16: 1013-1023.
- Bolton T. B., Prestwich S. A., Zholos A. V., and Gordienko D. V. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 85-115.
- Bolton T. B. Calcium events in smooth muscles and their interstitial cells; physiological roles of sparks. *J Physiol* 2006; 570: 5-11.
- Börjesson L., Nordgren S., and Delbro D. S. DMPP causes relaxation of rat distal colon by a purinergic and a nitrgenic mechanism. *Eur J Pharmacol* 1997; 334: 223-231.
- Börjesson L., Nordgren S., and Delbro D. S. K⁺-induced neurogenic relaxation of rat distal colon. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 717-724.
- Borody T. J., Quigley E. M. M., Phillips S. F., Weinbeck M., Tucker R. L., Haddad A., and Zinsmeister A. R. Effects of morphine and atropine on motility and transit in the human ileum. *Gastroenterology* 1985; 89: 562-570.
- Bossone C., Hosseini J. M., Pineiro-Carrero V., and Shea-Donohue T. Alterations in spontaneous contractions *in vitro* after repeated inflammation of rat distal colon. *Am J Physiol* 2001; 280: G949-G957.
- Brehmer A., Schrod F., and Neuhuber W. Morphological classifications of enteric neurons-100 years after Dogiel [in process citation]. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 2: 125-135.
- Briejer M. R., Akkermans L. M., and Schuurkes J. A. Interactions of serotonin with multiple receptors and neurotransmitters in the guinea-pig isolated colon. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1995; 329: 121-133.
- Brookes S. Retrograde tracing of enteric neuronal pathways. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 1-18.
- 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.
- Burleigh D. E., Levine D. F., and Motson R. W. A method for studying the actions of drugs on motility of vascularly perfused segments of human colon. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984; 272: 118-128.
- 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.

- Calderone V., Chericoni S., Martinelli C., Testai L., Nardi A., Morelli I., Breschi M. C., and Martinotti E. Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 370: 290-298.
- 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.
- Cao W., Pricolo V. E., Zhang L., Behar J., Biancani P., and Kirber M. T. Gq-linked NK₂ receptors mediate neurally induced contraction of human sigmoid circular smooth muscle. *Gastroenterology* 2000; 119: 51-61.
- Capasso R., and Tavares I. A. Effect of the flavonoid galangin on urinary bladder rat contractility *in vitro*. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 1147-1150.
- 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.
- 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.
- Castle N. A. Recent advances in the biology of small conductance calcium-activated potassium channels. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1999; 15/16: 131-154.
- Cayabyab F. S., Jimenez M., Vergra P., De Bruin H., and Daniel E. E. Influence of nitric oxide and vasoactive intestinal peptide on the spontaneous and triggered electrical and mechanical activities of the canine ileum. *Can J Physiol* 1997; 75: 383-397.
- Ceregrzyn M., and Kuwahara A. The effect of epigallocatechin gallate on intestinal motility in mice. *Environ Health Prevent Med* 2003; 8: 47-51.
- Cetin A., Kaya T., Demirkopulu N., Karadas B., Duran B., and Cetin M. YC-1, a nitric oxide-independent activator of soluble guanylate cyclase, inhibits the spontaneous contractions of isolated pregnant rat myometrium. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 19-24.
- Chen Z. Y., Chan P. T., Ho K. Y., Fung K. P., and Wang J. Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chem Phys Lipids* 1996; 79: 157-163.
- 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.
- Choi K. L., Mossman C., Aube J., and Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. *Neuron* 1993; 10: 533-541.
- Christensen J. The motility of the colon. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*, edited by Johnston L. R. Raven Press, New York: 1994, p. 991-1023.
- Ciccocioppo R., Onori L., Messori E., Candura S. M., Coccini T., and Tonini M. Role of nitric oxide-dependent and -independent mechanisms in peristalsis and accommodation in the rabbit distal colon. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270: 929-937.
- Cook A. K., Carty M., Singer C. A., Yamboliev I. A., and Gerthoffer W. T. Coupling of M₂ muscarinic receptors to ERK MAP kinases and caldesmon phosphorylation in colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G429-G437.
- Costa M., Brookes S. J. H., Steele P. A., Gibbins I., Burner E., and Kandiah C. J. Neurochemical classification of myenteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neuroscience* 1996; 75: 949-967.
- Cowles V. E. and Sarna S. K. Relation between small intestinal motor activity and transit in secretory diarrhea. *Am J Physiol* 1990; 259: G420-G429.
- Crema A., Frigo G. M., and Lecchini S. Pharmacological analysis of the peristaltic reflex in the isolated colon of the guinea pig or cat. *Br J Pharmacol* 1970; 39: 334-345.
- Dambros M., de Jongh R., van Koeveeringe G. A., van D. M., De Mey J. G., Palma P. C., and van Kerrebroeck P. E. Multiple-signaling pathways are involved in the inhibitory effects of galangin on urinary bladder contractility. *NeuroUrol Urodyn* 2005a; 24: 369-373.
- Dambros M., van D. M., de Jongh R., van Koeveeringe G. A., De Mey J. G., and van K. P. The inhibitory effect of the flavonoid galangin on urinary bladder smooth muscle contractility is mediated in part by modulation of Ca²⁺ release from intracellular stores. *Planta Med* 2005b; 71: 962-964.
- Daniel E. E., and Wang Y. F. Gap junctions in intestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 309-320.

- Daniel E. E., Thomas J., Ramnarain M., Bowes T. J., and Jury J. Do gap junctions couple interstitial cells of Cajal pacing and neurotransmission to gastrointestinal smooth muscle? *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 297-307.
- Daniel E. E. Communication between interstitial cells of Cajal and gastrointestinal muscle. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 118-122.
- Dar A., and Channa S. Calcium antagonistic activity of *Bacopa monniera* on vascular and intestinal smooth muscles of rabbit and guinea-pig. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 167-174.
- Davies M. P., McCurrie J. R., and Wood D. Comparative effects of K⁺ channel modulating agents on contractions of rat intestinal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1996; 297: 249-256.
- De Groat W. C., and Krier J. The central control of the lumbar sympathetic pathway of the large intestine of the cat. *J Physiol* 1979; 289: 449-468.
- De Groat W. C., Booth A. M., Milne R. J., and Roppolo J. R. Parasympathetic preganglionic neurones in the sacral spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 1982; 5: 23-43.
- Denninger J. W., and Marletta M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 334-350.
- Di Carlo G., Autore G., Izzo A. A., Maiolino P., Mascolo N., Viola P., Diurno M. V., and Capasso F. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 1054-1059.
- Di Pietro A., Conseil G., Pérez-Victoria J. M., Dayan G., Baubichon-Cortay H., Trompier D., Stenfels E., Jault J. M., de Wet H., Maitrejean M., Comte G., Boumendjel A., Mariotte A. M., Dumontet C., McIntosh D. B., Goffeau A., Castanys S., Gamarro F., and Barron D. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 307-322.
- 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.
- DiChiara T. J., and Reinhart P. H. Redox modulation of hsl α Ca²⁺-activated K⁺ channels. *J Neurosci* 1997; 17: 4942-4955.
- 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.
- Donnelly G., Jackson T. D., Ambrous K., Ye J., Safdar A., Farraway L., and Huizinga J. D. The myogenic component in distention-induced peristalsis in the guinea pig small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G491-G500.
- Drago F., Macaudo S., and Salehi S. Small doses of melatonin increase intestinal motility in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1969-1974.
- Duarte J., Perez V. F., Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J., and Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1993; 24: 857-862.
- Duarte J., Ocete M. A., Perez-Vizcaino F., Zarzuelo A., and Tamargo J. Effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on aortic contraction and induction of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 1997; 338: 25-33.
- Durdle N. G., Kingma Y. J., Bowes K. L., and Chambers M. M. Origin of slow waves in the canine colon. *Gastroenterology* 1983; 84: 375-382.
- Ehrlein H. J., Reich H., and Schwinger M. Physiological significance of the contractions of the rabbit proximal colon. *Q J Exp Physiol* 1982; 67: 407-417.
- El-Mahmoudy A., Matsuyama H., Khalifa M., Shimizu Y., and Takewaki T. Tachykinins mediate non-adrenergic, non-cholinergic excitatory neurotransmission to the hamster ileum via NK₁ and NK₂ receptors. *Life Sci* 2003; 73: 1939-1951.
- el-Sharkawy T. Y. Electrical activities of the muscle layers of the canine colon. *J Physiol* 1983; 342: 67-83.
- 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.
- Farrugia G., Holm A. N., Rich A., Sarr M. G., Szurszewski J. H., and Rae J. L. A mechanosensitive calcium channel in human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1999; 117: 900-905.
- Fida R., Lyster D. J., Bywater R. A., and Taylor G. S. Colonic migrating motor complexes (CMMCs) in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil* 1997; 9: 99-107.

- Firth T. A., Mawe G. M., and Nelson M. T. Pharmacology and modulation of K_{ATP} channels by protein kinase C and phosphatases in gallbladder smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C1031-C1037.
- 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.
- Franck H., Sweeney K. M., Sanders K. M., and Shuttleworth C. W. Effects of a novel guanylate cyclase inhibitor on nitric oxide-dependent inhibitory neurotransmission in canine proximal colon. *Br J Pharmacol* 1997; 122: 1223-1229.
- Furness J. B., and Costa M. The enteric nervous system. *Edinburgh: Churchill Livingstone* 1987.
- Furness J. B., and Bornstein J. C. The enteric nervous system and its extrinsic connections. In: Textbook of Gastroenterology, edited by Yamada T. Philadelphia: J.B. Lippincott., 1991, p. 2-24.
- Furness J. B., Kunze W. A. A., Bertrand P. P., Clerc N., and Bornstein J. C. Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 1-18.
- Furness J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 87-96.
- Furness J. B., and Clerc N. Responses of afferent neurons to the contents of the digestive tract, and their relation to endocrine and immune responses. *Prog Brain Res* 2000; 122: 159-172.
- Furness J. B., Clerc N., Gola M., Kunze W. A., and Fletcher E. K. Identification of component neurons and organisation of enteric circuits. In: Falk symposium. Neurogastroenterology. From basic to the clinics, edited by Krammer H., and Singer M.V. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000, p. 137-150.
- Furness J. B., and Sanger G. J. Intrinsic nerve circuits of the gastrointestinal tract: identification of drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 612-622.
- 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.
- Gabella T., and Blundell D. Gap junctions of the muscle of the small and large intestine. *Cell Tissue Res* 1981; 219: 469-488.
- Gallego D., Hernandez P., Clave P., and Jiménez M. P2Y1 receptors mediate inhibitory purinergic neuromuscular transmission in the human colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G584-G594.
- Galligan J. J., Furness J. B., and Costa M. Effects of cholinergic blockade, adrenergic blockade and sympathetic denervation on gastrointestinal myoelectric activity in guinea-pig. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 1114-1125.
- Galligan J. J. Mechanisms of excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *Tokai J Exp Clin Med* 1998; 23: 129-136.
- Galligan J. J., LePard K. J., Schneider D. A., and Zhou X. Multiple mechanisms of fast excitatory synaptic transmission in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 2000; 81: 97-103.
- Galligan J. J. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 611-623.
- Gee J. M., Dupont M. S., Rhodes M. J. C., and Johnson I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 19-25.
- Gelal A., and Guven H. Characterization of 5-HT receptors in rat proximal colon. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 343-346.
- Gharzouli K., and Holzer P. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology* 2004; 70: 5-14.
- Gilani A. H., Khan A. U., Ghayur M. N., Ali S. F., and Herzig J. W. Antispasmodic Effects of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) is Mediated Predominantly through K^+ Channel Activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99: 365-373.
- Goldstein S. A., Pheasant D. J., and Miller C. The charybdotoxin receptor of a Shaker K^+ channel: Peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 1993; 12: 1377-1388.
- Gomez-Munoz A., O'Brien L., Salh B., and Steinbrecher U. P. 5-Aminosalicylate stimulates phospholipase D activity in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1533: 110-118.
- Gonella J., Bouvier M., and Blanquet F. Extrinsic nervous control of motility of small and large intestines and related sphincters. *Physiol Rev* 1987; 67: 902-961.
- Gonzales E., Iglesias I., Carretero E., and Villar A. Gastric cytoprotection of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2000; 70: 329-333.
- Gonzalez A., and Sarna S. K. Neural regulation of *in vitro* giant contractions in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001a; 281: G275-G282.

- 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* 2001b; 280: G546-G554.
- Goyal R. K., and Hirano I. Mechanisms of disease: the enteric nervous system. *New Engl J Med* 1996; 334: 1106-1115.
- Goyal R. K., and Xue D. H. Evidence for NO⁻ redox form of nitric oxide as nitrergic inhibitory neurotransmitter in gut. *Am J Physiol* 1998; 275: G1185-G1192.
- Grasa L., Rebollar 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.
- 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.
- Green J. T., Richardson C., Marshall R. W., Rhodes J., McKirdy H. C., Thomas G. A., and Williams G. T. Nitric oxide mediates a therapeutic effect of nicotine in ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1429-1434.
- Grider J. R., Murthy K. S., Jin J. G., and Makhlof G. M. Stimulation of nitric oxide from muscle cells by VIP: prejunctional enhancement of VIP release. *Am J Physiol* 1992; 262: G774-G778.
- Gunin, A. Histology images digestive system: Intestine. www.histol.chuvashi.com. 2000.
- Hammad H. M., and Abdalla S. S. Pharmacological effects of selected flavonoids on rat isolated ileum: structure-activity relationship. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 767-771.
- Hanani M., Louzon V., Miller S. M., and Fausone-Pellegrini M. S. Visualization of interstitial cells of Cajal in the mouse colon by vital staining. *Cell Tissue Res* 1998; 292: 275-282.
- Hanani M., and Freund H. R. Interstitial cells of Cajal-their role in pacing and signal transmission in the digestive system. *Acta Physiol Scand* 2000; 170: 177-190.
- Hansen M. B. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiol Res* 2003a; 52: 1-30.
- Hansen M. B. The enteric nervous system I: Organisation and classification. *Pharmacol Toxicol* 2003b; 92: 105-113.
- Harborne J. B., and Williams C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55: 481-504.
- Hashitani H., and Suzuki H. Properties of spontaneous Ca²⁺ transients recorded from interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra *in situ*. *J Physiol* 2007; 583: 505-519.
- Hata F., Takeuchi T., Nishio H., and Fujita A. Mediators and intracellular mechanisms of NANC relaxation of smooth muscle in the gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* 2000; 36: 181-204.
- Hazekamp A., Verpoorte R., and Panthong A. Isolation of a bronchodilator flavonoid from the Thai medicinal plant *Clerodendrum petasites*. *J Ethnopharmacol* 2001; 78: 45-49.
- Herrera M. D., Zarzuelo A., Jimenez J., Marhuenda E., and Duarte J. Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *Gen Pharmacol* 1996; 27: 273-277.
- Herrera G. M., Heppner T. J., and Nelson M. T. Regulation of urinary bladder smooth muscle contractions by ryanodine receptors and BK and SK channels. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 279: R60-R68.
- Hisada T., Walsh J. V. Jr., and Singer J. J. Stretch-inactivated cationic channels in single smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1993; 422: 393-396.
- Ho K., Nichols C. G., Lederer W. J., Lytton J., Vassilev P. M., Kanazirska M. V., and Hebert S. C. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 1993; 362: 31-38.
- Hodek P., Trefil P., and Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions* 2002; 139: 1-21.
- Hofmann F. The Biology of Cyclic GMP-dependent Protein Kinases. *J Biol Chem* 2005; 280: 1-4.
- Hollenberg M. D. Tyrosine kinase pathways and the regulation of smooth muscle contractility. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 108-114.
- Holzer P., Lippe I. T., Tabrizi A. L., Lenard L., Jr., and Barthó L. Dual excitatory and inhibitory effect of nitric oxide on peristalsis in the guinea pig intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 154-161.
- Holzer P., Schicho R., Holzer-Petsche U., and Lippe I. T. The gut as a neurological organ. *Wien Klin Wochenschr* 2001; 113: 647-660.
- Holzer P. Sensory neurone responses to mucosal noxae in the upper gut: relevance to mucosal integrity and gastrointestinal pain. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 459-475.

- Hong J., Smith T. J., Ho C. T., August D. A., and Yang C. S. Effects of purified green and black tea polyphenols on cyclooxygenase- and lipoxygenase-dependent metabolism of arachidonic acid in human colon mucosa and colon tumor tissues. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 1175-1183.
- Hosseini J. M., Goldhill J. M., Bossone C., Pineiro-Carrero V., and Shea-Donohue T. Progressive alterations in circular smooth muscle contractility in TNBS-induced colitis in rats. *Neurogastroenterol Motil* 1999; 11: 347-356.
- Huang Y., Wong C. M., Lau C. W., Yao X., Tsang S. Y., Su Y. L., and Chen Z. Y. Inhibition of nitric oxide/cyclic GMP-mediated relaxation by purified flavonoids, baicalin and baicalein, in rat aortic rings. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 787-794.
- Hudgins P. M., and Bond G. H. Alteration by vanadate of contractility in vascular and intestinal smooth muscle preparations. *Pharmacology* 1981; 23: 156-164.
- Hudson L. C. Horseradish peroxidase study of the location of extrinsic efferent and afferent neurons innervating the colon of the dog. *Am J Vet Res* 1990; 51: 1875-1881.
- Huizinga J. D., Diamant N. E., and el-Sharkawy T. Y. Electrical basis of contractions in the muscle layers of the pig colon. *Am J Physiol* 1983; 245: G482-G491.
- Huizinga J. D., Stern H. S., Chow E., Diamant N. E., and el-Sharkawy T. Y. Electrophysiologic control of motility in the human colon. *Gastroenterology* 1985; 88: 500-511.
- Huizinga J. D., Robinson T. L., and Thomsen L. The search for the origin of rhythmicity in intestinal contraction; from tissue to single cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 3-9.
- Huizinga J. D., Golden C. M., Zhu Y., and White E. J. Ion channels in interstitial cells of Cajal as targets for neurotransmitter action. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 106-111.
- Ikemoto S., Sugimura K., Yoshida N., Yasumoto R., Wada S., Yamamoto K., and Kishimoto T. Antitumor effects of scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology* 2000; 55: 951-955.
- 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.
- Inoue R., and Isenberg G. Acetylcholine activates nonselective cation channels in guinea pig ileum through G protein. *Am J Physiol* 1990; 258: C1173-C1178.
- Irving H. R., Tan Y. Y., Tochon-Danguy N., Liu H., Chetty N., Desmond P. V., Pouton C. W., and Coupar I. M. Comparison of 5-HT₄ and 5-HT₇ receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. *Life Sci* 2007; 80: 1198-1205.
- Ishikawa K., and Ozaki T. Distribution of several gut neuropeptides and their effects on motor activity in muscularis mucosae of guinea-pig proximal colon. *J Auton Nerv Syst* 1997; 64: 91-100.
- Janssen L. J., and Sims S. M. Acetylcholine activates non-selective cation and chloride conductances in canine and guinea-pig tracheal myocytes. *J Physiol* 1992; 453: 197-218.
- Jenkinson D. H. Potassium channels – multiplicity and challenges. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S63-S71.
- Jeon S. B., Kim G., Kim J. I., Seok Y. M., Kim S. H., Suk K., Shin H. M., Lee Y. H., and Kim I. K. Flavone inhibits vascular contraction by decreasing phosphorylation of the myosin phosphatase target subunit. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 1116-1120.
- Jin X., Morsy N., Shoeb F., Zavzavadjian J., and Akbarali H. I. Coupling of M₂ muscarinic receptor to L-type Ca channel via c-src kinase in rabbit colonic circular smooth muscle. *Gastroenterology* 2002; 123: 827-834.
- 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.
- Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano K. I., Harada K. I., Miyamoto S., Nakazawa H., Won K. J., and Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 157-230.
- Keef K. D., Shuttleworth C. W. R., Xue C., Bayguinov O., Publicover N. G., and Sanders K. M. Relationship between nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide in enteric inhibitory neurotransmission. *Neuropharmacology* 1994; 33: 1303-1314.
- Keef K. D., Murray D. C., Sanders K. M., and Smith T. K. Basal release of nitric oxide induces an oscillatory motor pattern in canine colon. *J Physiol* 1997; 499 (Pt 3): 773-786.

- Kim H. P., Mani I., Iversen L., and Ziboh V. A. Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 1998; 58: 17-24.
- Kim S. H., Kang K. W., Kim K. W., and Kim N. D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci* 2000; 67: 121-131.
- Kishibayashi N., and Karasawa A. Stimulating effects of KW-5092, a novel gastroprokinetic agent, on the gastric emptying, small intestinal propulsion and colonic propulsion in rats. *Jpn J Pharmacol* 1995; 67: 45-50.
- 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.
- Ko W. C., Wang H. L., Lei C. B., Shih C. H., Chung N. I., and Lin C. N. Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med* 2002; 68: 30-35.
- Kobayashi S., Ikeda K., Miyata K., Yamada T., and Honda K. A method for measurement of muscarinic receptor-mediated responses in dissociated single colon longitudinal smooth muscle cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2001; 45: 199-205.
- Koh S. D., Bradley K. K., Rae M. G., Keef K. D., Horowitz B., and Sanders K. M. Basal activation of ATP-sensitive potassium channels in murine colonic smooth muscle cell. *Biophys J* 1998; 75: 1793-1800.
- Kreulen D.L., and Szurszewski J.H. Electrophysiological and morphological basis for organisation of neurons in prevertebral ganglia. In the: *Frontiers of Knowledge in the Diarrheal Diseases: International Colloquium in Gastroenterology*. Janowitz H. D., and Sachor D. B. (Upper Montclair, NJ: Projects in Health) 1979; 211-226.
- 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.
- Kwon S. C., Ozaki H., and Karaki H. NO donor sodium nitroprusside inhibits excitation-contraction coupling in guinea pig taenia coli. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G1235-G1241.
- La Casa C., Villegas I., Alarcón de la Lastra C., Motilva V., and Martín Calero M. J. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 45-53.
- 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: 397-408.
- Leal L. K., Costa M. F., Pitombeira M., Barroso V. M., Silveira E. R., Canuto K. M., and Viana G. S. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. *Life Sci* 2006; 79: 98-104.
- Lebas F., Lamboley B., and Fortun Lamothe L. Effects of dietary energy level and origin (starch vs oil) on gross and fatty acid composition of rabbit milk. *Proc 6th World Rabbit Congress* 1996; 1: 223-226.
- Lebrun P., Becker B., Morel N., Ghisdal P., Antoine M. H., de T. P., and Pirotte B. K_{ATP} channel openers: Tissue selectivity of original 3-alkylaminopyrido- and 3-alkylaminobenzothiadiazine 1,1-dioxides. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 468-475.
- Lecci A., Santicioli P., and Maggi C. Pharmacology of transmission to gastrointestinal muscle. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 630-641.
- Lee H. K., Bayguinov O., and Sanders K. M. Role of nonselective cation current in muscarinic responses of canine colonic muscle. *Am J Physiol* 1993; 265: C1463-C1471.
- Lemos V. S., Freitas M. R., Muller B., Lino Y. D., Queiroga C. E., and Cortes S. F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur J Pharmacol* 1999; 386: 41-46.
- Lewis D. A., and Shaw G. P. A natural flavonoid and synthetic analogues protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Nutr Biochem* 2001; 12: 95-100.
- Li M., Johnson C. P., Adams M. B., and Sarna S. K. Cholinergic and nitrenergic regulation of *in vivo* giant migrating contractions in rat colon. *Am J Physiol* 2002; 283: G544-G552.
- Li Y., Starrett J. E., Meanwell N. A., Johnson G., Harte W. E., Dworetzky S. I., Boissard C. G., and Gribkoff V. K. The discovery of novel openers of Ca²⁺-dependent large conductance potassium channels: pharmacophore search and physiological evaluation of flavonoids. *Bioorg Med Chem Lett* 1997; 1: 759-762.
- Liang Y. C., Huang Y. T., Tsai S. H., Lin-Shiau S. Y., Chen C. F., and Lin J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related favonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999; 20: 1945-1952.

- Liang Y. C., Tsai S. H., Tsai D. C., Lin-Shiau S. Y., and Lin J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters* 2001; 496: 12-18.
- Lino M. Biphasic Ca^{2+} dependence of inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca release in smooth muscle of the guinea-pig taenia caeci. *J Gen Physiol* 1990; 95: 1103-1122.
- Lippi A., Santicioli P., Criscuoli M., and Maggi C. A. Depolarization evoked co-release of tachykinins from enteric nerves in the guinea-pig proximal colon. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 357: 245-251.
- Liu X., Rusch N. J., Striessnig J., and Sarna S. K. Down-regulation of L-type calcium channels in inflamed circular smooth muscle cells of the canine colon. *Gastroenterology* 2001; 120: 480-489.
- Lomax A. E., Sharkey K. A., Bertrand P. P., Low A. M., Bornstein J. C., and Furness J. B. Correlation of morphology, electrophysiology and chemistry of neurons in the myenteric plexus of the guinea-pig distal colon. *J Auton Nerv Syst* 1999; 76: 45-61.
- 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.
- Longhurst P. A., and Uvelius B. Pharmacological techniques for the *in vitro* study of the urinary bladder. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2001; 45: 91-108.
- Lopez G. A., Jan Y. N., and Jan L. Y. Evidence that the S6 segment of the Shaker voltage-gated K^+ channel comprises part of the pore. *Nature* 1994; 367: 179-182.
- Lu G., Mazet B., Sarr M. G., and Szurszewski J. H. Effect of nitric oxide on calcium-activated potassium channels in colonic smooth muscle of rabbits. *Am J Physiol* 1998; 274: G848-G856.
- Lynn S., Morgan J. M., Lamb H. K., Meissner G., and Gillespie J. L. Isolation and partial cloning of ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channel protein isoforms from human myometrial muscle. *FEBS Lett* 1995; 372: 6-12.
- Mackenna B. R., and McKirdy H. C. Peristalsis in the rabbit distal colon. *J Physiol* 1972; 220: 33-54.
- MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* 1991; 350: 232-235.
- Maeda H., Yamagata A., Nishikawa S., Yoshinaga K., Kobayashi S., Nishi K., and Nishikawa S. Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992; 116: 369-375.
- Maggi C. A., Santicioli P., Manzini S., and Meli A. Contribution of neurogenic and myogenic factors to the contractile activity of the guinea-pig distal colon *in vivo* and *in vitro*. *J Auton Pharmacol* 1985; 5: 177-187.
- Maggi C. A., Zagorodnyuk V., and Giuliani S. Specialization of tachykinin NK1 and NK2 receptors in producing fast and slow atropine-resistant neurotransmission to the circular muscle of the guinea-pig colon. *Neuroscience* 1994; 63: 1137-1152.
- Maggi C. A., Giuliani S., and Zagorodnyuk V. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the circular muscle of guinea-pig colon: role as inhibitory transmitter and mechanisms of relaxation. *Regul Pept* 1996; 61: 27-36.
- Malik-Hall M., Ganellin C. R., Galanakis D., and Jenkinson D. H. Compounds that block both intermediate-conductance (IKCa) and small-conductance (SKCa) calcium-activated potassium channels. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1431-1438.
- Mann P. T., Furness J. B., and Southwell B. R. Choline acetyltransferase immunoreactivity of putative intrinsic primary afferent neurons of the rat ileum. *Cell Tissue Res* 1998; 297: 241-248.
- Mashimo H., He X. D., Huang P. L., Fishman M. C., and Goyal R. K. Neuronal Constitutive Nitric Oxide Synthase Is Involved in Murine Enteric Inhibitory Neurotransmission. *J Clin Invest* 1996; 98: 8-13.
- Matsuda N. M., Miller S. M., Sha L., Farrugia G., and Szurszewski J. H. Mediators of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory neurotransmission in porcine jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 605-612.
- 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.
- 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.
- McGeown G. J. Interactions between inositol 1,4,5-triphosphate receptors and ryanodine receptors in smooth muscle: one store or two? *Cell Calcium* 2004; 35: 613-619.
- McKirdy H. C. Functional relationship of longitudinal and circular layers of the muscularis externa of the rabbit large intestine. *J Physiol* 1972; 227: 839-853.

- McKirdy H. C., Richardson C. E., Green J. T., Rhodes J., Williams G. T., and Marshall R. W. Differential effect of nitric oxide synthase inhibition on sigmoid colon longitudinal and circular muscle responses to nicotine and nerve stimulation *in vitro*. *Br J Surg* 2004; 91: 229-234.
- McRorie J., Krier J., and Adams T. Morphology and projections of myenteric neurones to colonic fibre bundles of the cat. *J Auton Nervous Syst* 1991; 32: 205-215.
- Mendes A., Desgranges C., Cheze C., Vercauteren J., and Freslon J. L. Vasorelaxant effects of grape polyphenols in rat isolated aorta. Possible involvement of a purinergic pathway. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 673-681.
- Messenger J. P., Bornstein J. C., and Furness J. B. Electrophysiological and morphological classification of myenteric neurons in the proximal colon of the guinea-pig. *Neuroscience* 1994; 60: 227-244.
- Middleton E. J. R., Kandaswami C., and Theoharides T. C. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 673-751.
- Middleton Jr. E. Some biological properties of plant flavonoids. *Ann Allergy* 1988; 61: 53-57.
- Miller S. M., Reed D., Sarr M. G., Farrugia G., and Szurszewski J. H. Haem oxygenase in enteric nervous system of human stomach and jejunum and co-localization with nitric oxide synthase. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 121-131.
- Morales M. A., Tortoriello J., Meckes M., Paz D., and Lozoya X. Calcium-antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Arch Med Res* 1994; 25: 17-21.
- Morello S., Vellecco V., Alfieri A., Mascolo N., and Cicala C. Vasorelaxant effect of the flavonoid galangin on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 2006; 78: 825-830.
- 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.
- 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* 1999; 127: 514-520.
- Mulè F., D'Angelo S., Tabacchi G., and Serio R. Involvement of tachykinin NK2 receptors in the modulation of spontaneous motility in rat proximal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 12: 459-466.
- Mulè F., Baffi M. C., Falzone M., and Cerra M. C. Signal Transduction Pathways Involved in the Mechanical Responses to Protease-Activated Receptors in Rat Colon. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 303: 1265-1272.
- Mulè F., Amato A., and Serio R. Role for NK1 and NK2 receptors in the motor activity in mouse colon. *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 196-202.
- Mungan Z., Arimura A., Ertan A., Rossowski W. J., and Copy D. H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide relaxes rat gastrointestinal smooth muscle. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 375-380.
- Murthy K. S., and Makhlof G. M. Differential coupling of muscarinic m₂ and m₃ receptors to adenylyl cyclases V/VI in smooth muscle. Concurrent m₂-mediated inhibition via Gα_{i3} and m₃-mediated stimulation via Gβγq. *J Biol Chem* 1997; 272: 21317-21324.
- Murthy K. S., and Makhlof G. M. Coexpression of ligand-gated P2X and G protein-coupled P2Y receptors in smooth muscle. Preferential activation of P2Y receptors coupled to phospholipase C (PLC)-beta1 via Galphaq/11 and to PLC-beta3 via Gbetagamma3. *J Biol Chem* 1998; 273(8): 4695-4704.
- Murthy K. S., Zhou H., Grider J. R., and Makhlof G. M. Sequential activation of heterotrimeric and monomeric G proteins mediates PLD activity in smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G381-G388.
- Murthy K. S. Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 345-374.
- Nakamura K., Kuraoka A., Kawabuchi M., and Shibata Y. Specific localization of gap junction protein, connexin 45, in the deep muscular plexus of dog and rat small intestine. *Cell Tissue Res* 1998; 292: 487-494.
- Nakayama S., Kajioaka S., Goto K., Takaki M., and Liu H. N. Calcium-associated mechanisms in gut pacemaker activity. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 958-968.
- Neunlist M., Dobрева G., and Schemann M. Characteristics of mucosally projecting myenteric neurones in the guinea-pig proximal colon. *J Physiol* 1999; 517: 533-546.
- Neutra M.R., and Padykula H.A. The gastrointestinal tract. In: Modern concepts of gastrointestinal histology, edited by Weiss L. New York. Amesterdam. Oxford: 1984, p. 658-706.
- Neylon C. B., Nurgali K., Hunne B., Robbins H. L., Moore S., Chen M. X., and Furness J. B. Intermediate-conductance calcium-activated potassium channels in enteric neurones of the mouse: pharmacological, molecular and

- immunochemical evidence for their role in mediating the slow afterhyperpolarization. *J Neurochem* 2004; 90: 1414-1422.
- Nilsson S. Autonomic Nerve Function in the Vertebrates. *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York* 1983.
- Oh S. T., Yedidag E., Conklin J. L., Martin M., and Bielefeldt K. Calcium release from intracellular stores and excitation-contraction coupling in intestinal smooth muscle. *J Surg Res* 1997; 71: 79-86.
- Ohta T., Kawai K., Ito S., and Nakazato Y. Ca^{2+} entry activated by emptying of intracellular Ca^{2+} stores in ileal smooth muscle of the rat. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1165-1170.
- Ohta T., Yasuda W., Hasegawa A., Ito S., and Nakazato Y. Effects of inhibitors for tyrosine kinase and non-selective cation channel on capacitative Ca^{2+} entry in rat ileal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2000; 387: 211-220.
- Okamura T., Tanobe Y., Fujioka H., Ayajiki K., and Toda N. Mechanism of neurogenic relaxation and modification of the response by enteric substances in isolated dog colon. *Eur J Pharmacol* 1998; 358: 245-252.
- Okishio Y., Takeuchi T., Fujita A., Suenaga K., Fujinami K., Munakata S., Takewaki T., and Hata F. Ascending contraction and descending relaxation in the distal colon of mice lacking interstitial cells of Cajal. *J Smooth Muscle Res* 2005; 41: 163-174.
- Olsson C., and Holmgren S. The control of gut motility. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001; 128: 481-503.
- Ono S., Mitsui R., Karki S., and Kuwahara A. Muscarinic and 5-HT₄ receptors participate in the regulation of the frequency of spontaneous contractions of the longitudinal muscle in rat distal colon. *Biomed Res* 2005; 26: 173-177.
- Onori L., Aggio A., Taddei G., and Tonini M. Contribution of NK₂ tachykinin receptors to propulsion in the rabbit distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G137-G147.
- Onori L., Aggio A., Taddei G., Ciccocioppo R., Severi C., Carnicelli V., and Tonini M. Contribution of NK₃ tachykinin receptors to propulsion in the rabbit isolated distal colon. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 211-219.
- Orallo F., Alvarez E., Basaran H., and Lugnier C. Comparative study of the vasorelaxant activity, superoxide-scavenging ability and cyclic nucleotide phosphodiesterase-inhibitory effects of hesperetin and hesperidin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 370: 452-463.
- Parent J.C. Le système digestif. In: Principes d'anatomie et de physiologie. Part 4: Le maintien de l'homéostasie, edited by Tortora G.J., and Grabowski S.R. CEC Collégial et universitaire. Canada: 1994, p. 814-873.
- Pascual J. M., Shieh C. C., Kirsch G. E., and Brown A. M. Multiple residues specify external tetraethylammonium blockade in voltage-gated potassium channels. *Biophys J* 1995; 69: 428-434.
- Percy W. H., Brunz J. T., Burgers R. E., Fromm T. H., Merkwand C. L., and van Dis J. Interrelationship between colonic muscularis mucosae activity and changes in transmucosal potential difference. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G479-G489.
- Petkov G. V., and Boev K. K. Cyclopiazonic acid-induced changes in contractile activity of smooth muscle strips isolated from cat and guinea-pig stomach. *Eur J Pharmacol* 1996; 318: 109-115.
- Plujà L., Yokoshiki H., and Sperelakis N. Evidence for presence of ATP-sensitive K^{+} channels in rat colonic smooth muscle cells. *Can J Physiol Pharmacol* 1998; 76: 1166-1170.
- Plujà L., Fernández E., and Jiménez M. Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle: putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 883-892.
- Plujà L., Fernández E., and Jiménez 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.
- Plujà L., Alberti E., Fernández E., Mikkelsen H. B., Thuneberg L., and Jiménez M. Evidence supporting the presence of two pacemakers in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G255-G266.
- Poggioli R., Benelli A., Arletti R., Cavazzuti E., and Bertolini A. K^{+} channel openers delay intestinal transit and have antidiarrheal activity. *Eur J Pharmacol* 1995; 287: 207-209.
- Poitras P. Pacemaker intestinal et péristaltisme. *Médecine/Sciences* 1998; 14: 966.
- Post J. M., and Hume J. R. Ionic basis for spontaneous depolarizations in isolated smooth muscle cells of canine colon. *Am J Physiol* 1992; 263: C691-C699.
- Powell A. K., and Bywater R. A. Endogenous nitric oxide release modulates the direction and frequency of colonic migrating motor complexes in the isolated mouse colon. *Neurogastroenterol Motil* 2001; 13: 221-228.

- Powell A. K., O'Brien S. D., Fida R., and Bywater R. A. Neural integrity is essential for the propagation of colonic migrating motor complexes in the mouse. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 495-504.
- Powell A. K., and Bywater R. A. Murine intestinal migrating motor complexes: longitudinal components. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 245-256.
- Prins N. H., Shankley N. P., Welsh N. J., Briejer M. R., Lefebvre R. A., Akkermans L. M., and Schuurkes J. A. An improved *in vitro* bioassay for the study of 5-HT₄ receptors in the human isolated large intestinal circular muscle. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1601-1608.
- Publicover N. G., Hammond E. M., and Sanders K. M. Amplification on nitric oxide signaling by isolated interstitial cells isolated from canine colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 2087-2091.
- 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.
- Rae M. G., Fleming N., McGregor D. B., Sanders K. M., and Keef K. D. Control of motility patterns in the human colonic circular muscle layer by pacemaker activity. *J Physiol* 1998; 510 (Pt 1): 309-320.
- Ranelletti F. O., Maggiano N., Serra F. G., Ricci R., Larocca L. M., Lanza P., Scambia G., Fattorossi A., Capelli A., and Piantelli M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 2000; 85: 438-445.
- Rattan S., Fan Y. P., and Puri R. N. Comparison of angiotensin II (Ang II) effects in the internal anal sphincter (IAS) and lower esophageal sphincter smooth muscles. *Life Sci* 2002; 70: 2147-2164.
- Revuelta M. P., Cantabrana B., and Hidalgo A. Depolarization-dependent effect of flavonoids in rat uterine smooth muscle contraction elicited by CaCl₂. *Gen Pharmacol* 1997; 29: 847-857.
- Revuelta M. P., Hidalgo A., and Cantabrana B. Involvement of cAMP and beta-adrenoceptors in the relaxing effect elicited by flavonoids on rat uterine smooth muscle. *J Auton Pharmacol* 1999; 19: 353-358.
- Revuelta M. P., Cantabrana B., and Hidalgo A. Mechanisms involved in kaempferol-induced relaxation in rat uterine smooth muscle. *Life Sci* 2000; 67: 251-259.
- Roghani M., Baluchnejadmojarad T., Vaez-Mahdavi M. R., and Roghani-Dehkordi F. Mechanisms underlying quercetin-induced vasorelaxation in aorta of subchronic diabetic rats: an *in vitro* study. *Vascul Pharmacol* 2005; 42: 31-35.
- Ruth P. Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding *in vivo* functions by gene targeting. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 355-372.
- Sanders K. M. Signal transduction in smooth muscle. Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1438-1449.
- Sanders K. M., Ordog T., and Ward S. M. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol* 2002; 282: G747-G756.
- Sanders K. M., Koh S. D., and Ward S. M. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343.
- Sanders K. M. Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 39-53.
- Santicioli P., Zagorodnyuk V., Renzetti A. R., and Maggi C. A. Antimuscarinic, calcium channel blocker and tachykinin NK₂ receptor antagonist actions of otilonium bromide in the circular muscle of guinea-pig colon. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1999; 359: 420-427.
- Saponara S., Testai L., Iozzi D., Martinotti E., Martelli A., Chericoni S., Sgaragli G., Fusi F., and Calderone V. (+/-)-Naringenin as large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK_{Ca}) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2006; 149: 1013-1021.
- Sarna S. K. Giant migrating contractions and their myoelectric correlates in the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1987; 253: G697-G705.
- Sarna S. K. Physiology and pathophysiology of colonic motor activity. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 827-862.
- Sarna S. K. *In vivo* signal-transduction pathways to stimulate phasic contractions in normal and inflamed ileum. *Am J Physiol* 1998; 274: G618-G625.
- Sarna S. K. Neuronal locus and cellular signaling for stimulation of ileal giant migrating and phasic contractions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G789-G797.

- 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.
- Satomi H. T., Yamamoto H., and Takatama H. Origins of parasympathetic preganglionic fibres to the cat intestine as demonstrated by the horseradish peroxidase method. *Brain Res* 1978; 151: 571-578.
- Sawyer G. W., and Ehlert F. J. Contractile roles of the M₂ and M₃ muscarinic receptors in the guinea pig colon. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 269-277.
- Sawyer G. W., Lambrecht G., and Ehlert F. J. Functional role of muscarinic M₂ receptors in α,β -methylene ATP induced, neurogenic contractions in guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1458-1464.
- Scalbert A., and Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000; 130: 2073S-2085S.
- Sengupta J.N., and Gebhart G.F. Gastrointestinal afferent fibers and sensation. In: Physiology of the gastrointestinal tract, edited by Johnson L.R. NewYork: 1994, p. 483-519.
- 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.
- Shieh C. C., Coghlan M., Sullivan J. P., and Gopalakrishnan M. Potassium channels: Molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 557-593.
- Shu S., Ju G., and Fan L. The glucose oxidase -DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett* 1988; 85: 169-171.
- Shuttleworth C. W., Weinert J. S., Sanders K. M., and Buxton I. L. Detection of nitric oxide release from canine enteric neurons. *J Auton Nerv Syst* 1995; 56: 61-68.
- Sim S. S., and Kim C. J. The involvement of protein kinase C and tyrosine kinase in vanadate-induced contraction. *Arch Pharm Res* 1998; 21: 315-319.
- Smith T. K., Reed J. B., and Sanders K. M. Interaction of two electrical pacemakers in muscularis of canine proximal colon. *Am J Physiol* 1987; 252: C290-C299.
- 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.
- Sohn U. D., Cao W., Tang D. C., Stull J. T., Haeberle J. R., Wang C. L. A., Harnett K. M., Behar J., and Biancani P. Myosin light chain kinase- and PKC-dependent contraction of LES and esophageal smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G467-G478.
- Somlyo A. P., and Somlyo A. V. Signal transduction by G proteins, Rhokinase and protein phosphatase to smooth muscle and non muscle myosin II. *J Physiol* 2000; 522: 177-185.
- Somlyo A. P., and Somlyo A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and non muscle myosin II: modulated by G proteins, kinases and phosphatases. *Physiol Rev* 2003; 83: 1325-1358.
- 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.
- Spencer N. J. Control of migrating motor activity in the colon. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 604-610.
- Summanen J., Vuorela P., Rauha J. P., Tammela P., Marjamaki K., Pasternack M., Tornquist K., and Vuorela H. Effects of simple aromatic compounds and flavonoids on Ca²⁺ fluxes in rat pituitary GH₄C₁ cells. *Eur J Pharmacol* 2001; 414: 125-133.
- Suthamnatpong N., Hata F., Kanada A., Takeuchi T., and Yagasaki O. Mediators of nonadrenergic, noncholinergic inhibition in the proximal, middle and distal regions of rat colon. *Br J Pharmacol* 1993a; 108: 348-355.
- Suthamnatpong N., Maehara T., Kanada A., Takeuchi T., and Hata F. Dissociation of cyclic GMP level from relaxation of the distal, but not the proximal colon of rats. *Jpn J Pharmacol* 1993b; 62: 387-393.
- Suzuki M., Li R. A., Miki T., Uemura H., Sakamoto N., Ohmoto-Sekine Y., Tamagawa M., Ogura T., Seino S., Marban E., and Nakaya H. Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 2001; 88: 570-577.
- Szurszewski J. H., and Farrugia G. Carbon monoxide is an endogenous hyperpolarizing factor in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16 Suppl 1: 81-85.
- Tabo M., Ohta T., Ito S., and Nakazato Y. Effects of external K⁺ on depletion-induced Ca²⁺ entry in rat ileal smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 1996; 313: 151-158.

- Takahashi T., and Owyang C. Regional differences in the nitrergic innervation between the proximal and the distal colon in the rats. *Gastroenterology* 1998; 115: 1504-1512.
- Takeuchi T., Kishi M., Ishii T., Nishio H., and Hata F. Nitric oxide-mediated relaxation without concomitant changes in cyclic GMP content of rat proximal colon. *Br J Pharmacol* 1996; 117: 1204-1208.
- 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.
- 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.
- Tameyasu T., Ogura S., and Ogihara K. The effect of e-,i- and n-Nitric oxide synthase inhibition on colonic motility in normal and muscular dystrophy (Mdx) mice. *Jpn J Physiol* 2004; 54: 555-566.
- Tammela P., Laitinen L., Galkin A., Wennberg T., Heczko R., Vuorela H., Peter Slotte J., and Vuorela P. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. *Arch Biochem Biophys* 2004; 425: 193-199.
- Tanaka Y., Koike K., Alioua A., and Toro L. β 1-Subunit of MaxiK Channel in Smooth Muscle: a Key Molecule Which Tunes Muscle Mechanical Activity. *J Pharmacol Sci* 2004; 94: 339-347.
- Tarakçi B., and Vaillant C. The location of extrinsic afferent and efferent neurons innervating the stomach and colon in rat. *Tr J of Veterinary and Animal Sciences* 1999; 23: 153-158.
- Thuneberg L. Interstitial cells of Cajal: intestinal pacemaker cells? *Adv Anat Embryol Cell Biol* 1982; 7: 1-130.
- Tomoda T., Aishima M., Takano N., Nakano T., Seki N., Yonemitsu Y., Sueishi K., Naito S., Ito Y., and Teramoto N. The effects of flavoxate hydrochloride on voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in human urinary bladder. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 25-32.
- Tonini M., Onori L., Lecchini S., Frigo G., Perucca E., and Crema A. Mode of action of ATP on propulsive activity in rabbit colon. *Eur J Pharmacol* 1982; 82: 21-28.
- 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.
- Uchiyama T., and Chess-Williams R. Muscarinic receptor subtypes of the bladder and gastrointestinal tract. *J Smooth Muscle Res* 2004; 40: 237-247.
- Uyama Y., Imaizumi Y., and Watanabe M. Effects of cyclopiazonic acid, a novel Ca²⁺-ATPase inhibitor, on contractile responses in skinned ileal smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 208-214.
- Uydes-Dogan B. S., Takir S., Ozdemir O., Kolak U., Topcu G., and Ulubelen A. The comparison of the relaxant effects of two methoxylated flavones in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 220-226.
- van Acker S. A. B. E., van Balen G. P., van den Berg D. J., Bast A., and van der Vijgh W. J. F. Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1998; 56: 935-943.
- Van Den Broucke C. O., and Lemli J. A. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. *Pharm Weekbl Sci* 1983; 5: 9-14.
- Van Geldre L. A., and Lefebvre R. A. Nitrergic relaxation in rat gastric fundus: influence of mechanism of induced tone and possible role of sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Life Sci* 2004; 74: 3259-3274.
- Vander A.J., Sherman J., and Luciano D.S. Human Physiology: The Mechanisms of Body Function. New York: The McGraw-Hill Companies, 2001.
- Vannucchi M. G. Receptors in interstitial cells of Cajal: identification and possible physiological roles. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 325-335.
- Venkova K., and Krier J. A nitric oxide and prostaglandin-dependent component of NANC off-contractions in cat colon. *Am J Physiol* 1994; 266: G40-G47.
- Venkova K., Van Meerveld B.G., and Krier J. Neural Control of the Large Intestine. In: Innervation of the gastrointestinal tract, edited by Brookes S., and Costa M. London and New York: 2003, p. 171-187.
- Vergara C., Latorre R., Marrion N. V., and Adelman J. P. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 1998; 8: 321-329.
- Vergara P., Fernandez E., Jiménez M., and Martin M. T. Gastrointestinal motility: Regulatory mechanisms. *Recent Res Devel Physiol* 2003; 1: 693-711.

- Villar I. C., Galisteo M., Vara R., O'Valle F., García-Saura M. F., Zarzuelo A., and Duarte J. Effects of the dietary flavonoid chrysin in isolated rat mesenteric vascular bed. *J Vasc Res* 2004; 41: 509-516.
- Vogalis F., Publicover N. G., Hume J. R., and Sanders K. M. Relation-ship between calcium current and cytosolic calcium in canine gastric smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1991; 260: C1012-C1018.
- Vogalis F., and Goyal R. K. Activation of small conductance Ca^{2+} -dependent K^+ channels by purinergic agonists in smooth muscle cells of the mouse ileum. *J Physiol* 1997; 502: 497-508.
- Vogalis F., Lang R. J., Bywater R. A., and Taylor G. S. Inhibition of voltage-activated K^+ currents in smooth muscle cells of the guinea pig proximal colon by noradrenergic agonists. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 239-245.
- Vogalis F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *J Auton Pharmacol* 2000; 20: 207-219.
- Vongtau H. O., Amos S., Binda L., Kapu S. D., Gamaniel K. S., Kunle O. F., and Wambebe C. Pharmacological effects of the aqueous extract of *Neorautanenia mitis* in rodents. *J Ethnopharmacol* 2000; 72: 207-214.
- Wang Y. X., Fleischmann B. K., and Kotlikoff M. I. M_2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and G_i/G_o requirements. *Am J Physiol* 1997; 273: C500-C508.
- Ward S. M., Burns A. J., Torihashi S., and Sanders K. M. Mutation of the proto-oncogene c-kit blocks development of interstitial cells and electrical rhythmicity in murine intestine. *J Physiol* 1994; 480: 91-97.
- Ward S. M., Beckett E. A. H., Wang X. Y., Baker F., Khoi M., and Sanders K. M. Interstitial cells of Cajal mediate cholinergic neurotransmission from enteric motor neurons. *J Neurosci* 2000; 20: 1393-1403.
- Ward S. M., and Sanders K. M. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 2001; 262: 125-135.
- Ward S. M., Baker S. A., de Faoite A., and Sanders K. M. Propagation of slow waves requires IP_3 receptors and mitochondrial Ca^{2+} uptake in canine colonic muscles. *J Physiol* 2003; 549: 207-218.
- Waterman S. A., Tonini M., and Costa M. The role of ascending excitatory and descending inhibitory pathways in peristalsis in the isolated guinea-pig small intestine. *J Physiol* 1994; 481: 223-232.
- Wayman C. P., Gibson A., and McFadzean I. Depletion of either ryanodine- or IP_3 -sensitive calcium stores activates capacitative calcium entry in mouse anococcygeus smooth muscle cells. *Pflügers Arch* 1998; 435: 231-239.
- Willenbacher R. F., Xie Y. N., Eysselein V. E., and Snape W. J., Jr. Mechanisms of cAMP-mediated relaxation of distal circular muscle in rabbit colon. *Am J Physiol* 1992; 262: G159-G164.
- Wood J. D. Application of classification schemes to the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst* 1994; 1: 17-29.
- Wood J. D. Neurogastroenterology and Gastrointestinal Motility. In: Medical physiology Part VII: Gastrointestinal Physiology, edited by Rhoades R.A., Tanner G.A., and Williams L. 2003, p. 449-480.
- 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* 2000; 97: 1851-1855.
- Yoshizumi M., Tsuchiya K., Kirima K., Kyaw M., Suzaki Y., and Tamaki T. Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 656-665.
- Zagorodnyuk V., Santicioli P., Maggi C. A., and Giachetti A. Evidence that tachykinin NK1 and NK2 receptors mediate non-adrenergic non-cholinergic excitation and contraction in the circular muscle of guinea-pig duodenum. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 237-246.
- Zhang Y. H., Park Y. S., Kim T. J., Fang L. H., Ahn H. Y., Hong J. T., Kim Y., Lee C. K., and Yun Y. P. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Gen Pharmacol* 2002; 35: 341-347.

Résumé

Le muscle lisse circulaire du côlon proximal, moyen et distal de lapin génère *in vitro* deux types de contractions spontanées: contractions phasiques (35% des bandelettes testées) de faible amplitude et de fréquence élevée et contractions géantes (65% des bandelettes) d'amplitude élevée et de fréquence faible. Les contractions géantes du muscle lisse du côlon moyen sont (1) insensibles à l'atropine 1 μM et à l'hexaméthonium 100 μM , (2) transitoirement abolies par le diméthyl phénylpipérazine 5 μM , (3) prolongées par la L-arginine 4 mM, (4) converties en contractions phasiques (augmentation du tonus) par le déqualinium 10 μM , le tétraéthylammonium 5 mM (62% des bandelettes), le bleu de méthylène 10 μM , l'orthovanadate 30 μM ou la néostigmine 1 μM , (5) totalement bloquées par le diazoxide 100 μM et (6) réduites par le nitroprussiate de sodium de manière concentration-dépendante. Ces données suggèrent que les contractions géantes ont une origine myogène et sont contrôlées par la libération de l'oxyde nitrique qui active la guanyl cyclase qui stimule à son tour l'ouverture des canaux K^+ par l'intermédiaire de GMPc. La quercétine et la flavone à différentes concentrations réduisent les contractions géantes et la contraction tonique induite par le carbachol 10^{-5} M et le KCl 80 mM. La contraction induite par le déqualinium et le tétraéthylammonium est réduite par la flavone et la quercétine 30 μM . La flavone 30 μM ne modifie pas l'inhibition de l'activité spontanée induite par le nitroprussiate de sodium. A 100 μM , elle diminue la contraction induite par le bleu de méthylène 100 μM , l'orthovanadate 1 mM et la néostigmine 10 μM . Le prétraitement du tissu avec la flavone 30 μM diminue le tonus induit par le déqualinium, le tétraéthylammonium et le bleu de méthylène. Une faible stimulation de l'activité spontanée est induite par seulement la flavone 30 μM après application du diazoxide. Ces résultats suggèrent que la quercétine et la flavone inhibent les contractions géantes par (1) inhibition des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants, (2) activation de la guanyl cyclase, (3) ouverture des canaux K^+ et (4) inhibition des tyrosines kinases.

Mots clés: canaux potassiques - côlon - contractions géantes - flavone - muscle lisse circulaire - quercétine - transmission nitregerique

المخلص

تبدى أشرطة العضلة الملساء الدائرية للقولون القريب والمتوسط والبعيد للأرنب نوعين من التقلصات التلقائية: تقلصات مرحلية (contractions phasiques) (35% من الأشرطة المختبرة) بسعة ضعيفة و تردد مرتفع و تقلصات عملاقة (65% من الأشرطة) ذات سعة مرتفعة و تردد ضعيف. التقلصات العملاقة للعضلة الملساء للقولون المتوسط (1) غير حساسة للأتروبين 1 ميكرومول/ل و hexaméthonium 100 ميكرومول/ل و (2) ملغاة بصفة مؤقتة بواسطة diméthyl phénylpipérazine 5 ميكرومول/ل و (3) ممددة بالأرجنين 4 ميليومول/ل و (4) محولة إلى تقلصات مرحلية (إرتفاع التوتر) بواسطة 10 déqualinium ميكرومول/ل و 5 tétraéthylammonium ميليومول/ل (62% من الأشرطة) وأزرق الميثيلان 10 ميكرومول/ل و orthovanadate 30 ميكرومول/ل و néostigmine 1 ميكرومول/ل و (5) منبثة كلياً بواسطة 100 diazoxide ميكرومول/ل و (6) مخفضة بواسطة nitroprussiate بطريقة متعلقة بالتركيز. تشير هذه النتائج إلى المنشأ العضلي للتقلصات العملاقة و مراقبتها بتحرير أكسيد النتريك الذي ينشط الغوانيل المحلقة والتي بدورها تنشيط فتح قنوات البوتاسيوم عن طريق الغوانيل أحادي الفوسفات الحلقي. تخفض الكارستين و الفلافون بتراكيز مختلفة التقلصات العملاقة و التقلص التوتري (contraction tonique) المحفز بواسطة الكرباكول 10^{-5} مول/ل و KCl 80 ميليومول/ل كما تخفضان (30 ميكرومول/ل) التقلص المحفز بإستعمال déqualinium و tétraéthylammonium. لا تغير الفلافون 30 ميكرومول/ل تثبيط النشاط التلقائي المحفز بواسطة nitroprussiate. بينما الفلافون بتركيز أعلى (100 ميكرومول/ل) تخفض التقلص المحفز بأزرق الميثيلان 100 ميكرومول/ل و orthovanadate 1 ميليومول/ل و néostigmine 10 ميكرومول/ل. تؤدي المعاملة المسبقة للنسيج بالفلافون 30 ميكرومول/ل إلى التثبيط الجزئي للتقلص التوتري المحفز بواسطة déqualinium و tétraéthylammonium. تحدث الفلافون 30 ميكرومول/ل فقط تحفيز ضعيف للنشاط التلقائي بعد تطبيق diazoxide. تشير هذه النتائج إلى أن الكارستين و الفلافون قادرتان على تثبيط التقلصات العملاقة بعدة آليات: (1) تثبيط قنوات الكالسيوم المرتبطة بالكمون و (2) تنشيط الغوانيل المحلقة و (3) فتح قنوات البوتاسيوم و (4) تثبيط التيروسين كيناز.

الكلمات المفاتيح: الإشارة بواسطة أكسيد النتريك- التقلصات العملاقة- العضلة الملساء الدائرية- الفلافون- القولون- الكارستين- قنوات البوتاسيوم