

UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

<u>Licence Sciences & Techniques</u> Sciences Biologiques Appliquées et Santé (LST - SBAS)

Etude de l'effet spasmolytique et myorelaxant des produits de synthèse K13 et RB1 sur le jéjunum d'un lapin

Présenté par : Occulis Ted Stacy

Encadré par: Pr Bencheikh Rachid (FST Fès)

Mr Alae Chda (doctorant)

Soutenu le: Mardi 11 juin 2019

Devant le jury composé de :

- Pr Bencheikh Rachid
- Pr Sefrioui S

<u>Stage effectué au : Laboratoire des molécules bioactives : structures et fonctions (FST Fès)</u>

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire des molécules bioactives : Structures et fonctions à la faculté des sciences et techniques de Fès.

D'abord je profite de cette occasion pour adresser mes sincères remerciements au Professeur Said Haloti, responsable de la filière Sciences Biologiques appliquées et santé.

Au Professeur Rachid Bencheikh, sans qui je n'aurais pas eu la chance d'effectuer ce stage, de m'avoir accueilli au sein du laboratoire, pour la confiance qu'il a eue en moi, pour ses conseils et ses compétences auxquels j'ai pu en bénéficier. Faire mon projet sous sa direction était pour moi un grand honneur.

Je ne trouve pas les mots pour exprimer ma gratitude envers M. Alae Chda mon encadrant de stage, ses conseils et ses encouragements ont permis à ce travail d'aboutir. Ses conseils m'ont aidé à surmonter beaucoup de difficultés, ses capacités scientifiques et ses compétences étaient mon grand support. La liberté qu'il m'a accordée et les responsabilités qu'il m'a confiées ont en grande partie contribué à mon autonomie de travail. Je le remercie chaleureusement pour sa patience, sa disponibilité, sa bonne humeur, sa pédagogie et son dévouement.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du Jury, je les remercie pour le soutien et l'attention qu'ils m'ont prêté pendant toute la durée de mon travail.

Enfin je ne peux oublier mes amis qui de près ou de loin était là depuis le début de mon parcours, qui m'ont toujours soutenu, encouragé et aider à avancer, à faire beaucoup plus d'effort afin d'atteindre mon ce but. Pour cela ils auront mon éternelle reconnaissance.

Dédicaces

Je dédie cet ouvrage à :

Mes très chers parents, Maxime Judith et Occulis Thimotée qui n'ont cessé de me soutenir et encourager durant ces années d'études. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Mes frères et sœurs, Occulis Mike Tom, Occulis Dean Curry et Occulis Betsy Judy W. qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotions, qui m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

Tous mes amis qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite plus de succès.

A tous ceux que j'aime

Merci!!

Sommaire

Principales abréviations

I .Introduction
Rappels bibliographiques
II.La cellule musculaire lisse (CML)
II.1. Types de muscles lisses
III.1Structure de la paroi de l'intestin grêle
IV.Automatisme du tube digestif
V.Les différents évènements aboutissant à la contraction et au relâchement musculaire7-8
VI.Action de l'acétylcholine sur la contraction musculaire viscéral8-9
VII.Matériel et méthodes10-11
VIII.Effet Myorelaxant des produits de synthèse
VIII.2 Préparation de la solution de Tyrode normal
IX.Effet spasmolytique des produits de synthèse
X.Résultats et discussion
X.1.Etude des contractions spontanées du jéjunum
X.2.Effet myorelaxant de K13 et RB1
X.3.Comparaison de l'effet spasmolytique des deux produits
X.4.Effet spasmolytique de RB1 et K13 sur le spasme induit par l'Acétylcholine (ACh).14-17
X.5. Effet de RB1
X.6.Effet spasmolytique de RB1 sur le spasme induit par KCl
X.7.Implication des CCVD dans l'effet spasmolytique du RB1
X.8.Etude comparative entre les deux produits

XI.Conclusion.	23
XII.Références	24

Liste d'abréviations

Ca²⁺: ions Calcium

KCl : chlorure de potassium

KCLM : kinase des chaines légères de myosine

CLMP: chaine légère de myosine phosphorylée

μl : microlitre

mg/ml: milligramme par millilitre

PKC: protéine kinase c

g/l : gramme par litre

REB: Rythme électrique de base

ACh: Acétylcholine

PLC: phospholipase C

PKC: protéine kinase C

mM:milli molaire

CCVD : Canaux calciques voltages dépendants

CML: Cellule musculaire lisse

STT : Système tubule transverse

I. Introduction

On peut définir, d'après la Rédaction medisite, les spasmes intestinaux comme étant des symptômes digestifs extrêmement fréquents qu'on rencontre dans de nombreuses pathologies. Que cela soit une colopathie fonctionnelle, la spasmophilie et le stress, tous peuvent être à l'origine de maux de ventre, de crampes abdominales et de troubles de la digestion.

Les colopathies fonctionnelles ou colite spasmodique ou encore syndrome du côlon irritable sont des troubles intestinaux qui se traduisent par divers symptômes digestifs, à commencer par des spasmes intestinaux qui peuvent être soit très localisés, soit plus diffus. Ils s'expriment par des contractions douloureuses, des brûlures, etc. Les autres symptômes caractéristiques des colopathies fonctionnelles sont les ballonnements (généralement après les repas) et des troubles du transit. Ainsi, on retrouve fréquemment des alternances entre des phases de constipation et de diarrhées. Selon plusieurs études, les colopathies fonctionnelles font partie des pathologies parmi les plus handicapantes dans la vie de tous les jours.

La spasmophilie par ailleurs se caractérise par la présence de spasme. Il s'agit en fait d'une hyperexcitabilité des muscles d'origine nerveuse qui se traduit par une tétanie musculaire. Entraînant donc une série de symptômes tels que des spasmes intestinaux (violentes crampes abdominales), comme la colite spasmodique une alternance entre diarrhées et constipation même si elles peuvent apparaître isolément, une acidité gastrique, des troubles de la déglutition, des ballonnements, des gaz et parfois une halitose (mauvaise haleine). Des troubles psychiques comme le stress, l'anxiété ou des crises d'angoisses peuvent être présente de façon significative en cas de spasmophilie. Par exemple, quand on a le trac avant de parler en public, avant de passer un examen, lorsqu'on est contrarié on peut être victime de spasmes intestinaux.

Afin de lutter contre ces troubles-là, plusieurs études ont été menés par des chercheurs, des industries pharmaceutiques, et des produits ont été synthétisés. Toutefois, dans le monde pharmaceutique, on ne s'arrête jamais à un seul médicament, on peut trouver un autre dont les effets sont encore meilleurs que le précédent.

Objectif du projet : nous nous proposons d'étudier l'effet de différents produits de synthèse sur l'intestin grêle (le jéjunum) d'un lapin afin de déterminer s'ils ont un effet spasmolytique ou non et éventuellement d'aborder leur mode d'action. Ces produits-là ont été synthétisé dans le laboratoire de chimie organique de la faculté des sciences de Dar el Merhaz et ramené à la faculté des sciences et techniques afin d'y être testé.

Pour notre expérimentation, nous avons retenus deux produits, à savoir K13 et RB1.

Les expérimentations se sont déroulées dans le laboratoire des molécules bioactives sous la supervision du Professeur Rachid Bencheikh et de Alae Chda Doctorant au sein du laboratoire.

Rappel Bibliographique

II. La cellule musculaire lisse

Les muscles lisses sont des muscles composés de cellules musculaires fusiformes uninucléées nommées léiomyocyte (Figure 1). Les fibres musculaires lisses tapissent la paroi des vaisseaux et de nombreux viscères creux. Ils entourent une cavité appelée lumière. Ces fibres musculaires se contractent lentement et indépendamment de la volonté, sous le contrôle du système nerveux autonome.

Leur membrane plasmique présente des invaginations appelées cavéolae qui sont l'équivalent des systèmes tubules transverses (STT) dans le muscle squelettique. Ces cellules participent à la fonction de plusieurs organes (estomac, intestin, vessie, utérus, etc...)

Elles ont pour caractéristiques, des contractions lentes soutenues et involontaire. Elles sont responsables des fonctions végétatives, comme la digestion, la vasoconstriction et la vasodilatation (Bolton et al 2004).

MUSCLE LISSE: SCHEMA GENERAL SIMPLIFIE

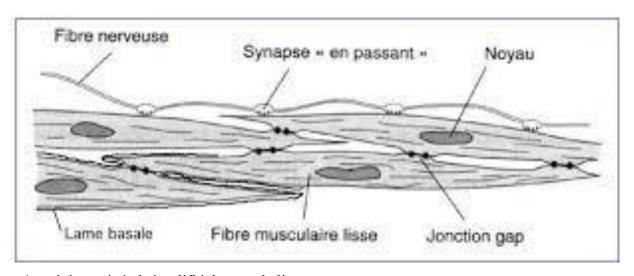


Figure 1 : schéma général simplifié du muscle lisse

II.1. Types de muscles lisses

Les muscles lisses constituent l'appareil végétatif des organes et des vaisseaux. On distingue habituellement deux grandes catégories :

- Le muscle lisse viscéral (unitaire) se contracte spontanément sous l'action d'un pacemaker localisé dans le tissu. Il est présent surtout dans la paroi des viscères creux (intestin, vaisseaux sanguins, uretère et utérus).
- Le muscle lisse multi unitaire, qui contrairement au muscle lisse unitaire ne se contracte pas spontanément. Leur contraction est déclenchée par une stimulation nerveuse. On le retrouve dans les contractions finement graduées (muscles ciliaires et de l'iris de l'œil, grands vaisseaux, muscles piloérecteurs).

III. L'intestin grêle

L'intestin est la partie de l'appareil digestif situé entre l'estomac et le colon (gros intestin). Situé dans la cavité abdominale au centre de l'abdomen, Il comprend un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles le jéjunum et l'iléon. C'est dans cette partie du tube digestif que se fait l'essentiel de la digestion (Figure 2).

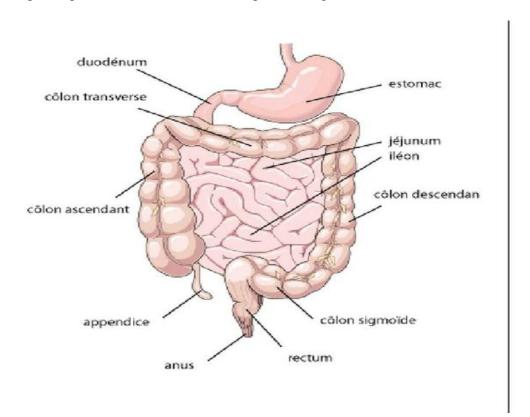


Figure 2 : Anatomie de l'appareil digestif

III.1 Structure de la paroi de l'intestin grêle

L'intestin grêle est formé de quatre (4) enveloppes :

- La muqueuse qui est la couche interne contenant de nombreuses glandes, secrétant notamment un mucus protecteur.
- La sous-muqueuse est la couche intermédiaire constituée notamment de vaisseaux et de nerfs.
- La musculeuse, une couche externe constituée de fibres musculaires.
- La membrane séreuse ou péritoine qui est une enveloppe tapissant la paroi externe de l'intestin grêle. (Figure 2)

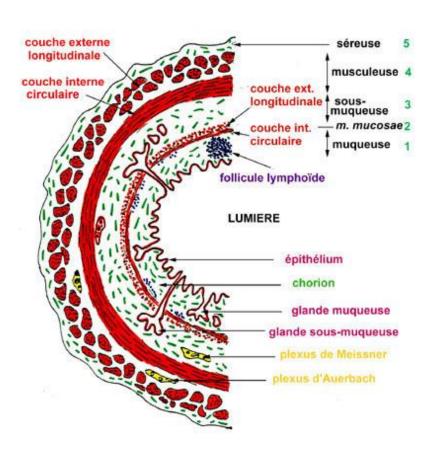


Figure 3 : Structure de la paroi de l'intestin grêle, dessinée en coupe transversale (Histo-Diderot Moodle Sorbonne-Paris-Cité)

IV. Automatisme du tube digestif

Dans l'organisme, l'intestin grêle se contracte et se relâche régulièrement. Cette motricité de l'intestin lui permet de faire progresser le chyme alimentaire (masse des aliments ayant subi la mastication et l'action de la salive et des sucs digestifs) vers le gros intestin.

Le muscle lisse viscéral (unitaire), se contracte spontanément sous l'action d'un pacemaker localisé dans le tissu. Cette contraction se propage à l'ensemble du muscle comme s'il s'agissait d'une seule unité. De plus, un segment d'intestin isolé de l'organisme, placé dans des conditions convenables, continue de se contracter rythmiquement ce qui veut dire que l'intestin a une motricité qui lui est propre. Il est dit automoteur.

L'automatisme du tube digestif (pacemaker) repose sur l'existence de cellules spécialisées, les cellules interstitielles de Cajal (CIC). Ce sont des cellules pauvres en éléments contractiles, principalement localisées entre les couches musculaires longitudinales et circulaires au voisinage des plexus myentériques. Elles ont trois (3) fonctions majeures :

- Elles assurent la dépolarisation des cellules musculaires lisses en ouvrant leurs canaux calciques voltage dépendant. Cela est à l'origine des ondes lentes qui déterminent un rythme électrique de base.
- Elles assurent la conduction électronique des ondes lentes.
- Elles assurent la liaison entre les motoneurones et les fibres lisses.

L'activité péristaltique des cellules interstitielles de Cajal est contrôlée par le système nerveux autonome.

V. Les différents évènements aboutissant à la contraction et au relâchement musculaire

L'entrée du Ca²⁺ extracellulaire par des canaux calciques sensibles au voltage active la machinerie contractile directement et va aussi stimuler le réticulum sarcoplasmique qui va libérer le peu de calcium qu'il contient au niveau des protéines contractiles à noter que le réticulum sarcoplasmique du muscle lisse n'est pas très riche en Ca²⁺.

Le Ca²⁺ se lie à la calmoduline et le complexe ainsi formé (CaM-Ca²⁺) active une enzyme, la kinase des chaines légères de la myosine (MLCK) (le complexe CaM-Ca²⁺-MLCK se forme). Ceci permet l'activation de l'ATPase myosine ainsi les chaines légères de chaque tête de

myosine sont phosphorylées par la myosine kinase et acquiert de ce fait la capacité de se lier aux filaments d'actine et d'initier la contraction musculaire.

Lorsque la contraction en ions calcium baisse, la myosine phosphatase déphosphoryle les chaines légères de la myosine d'où relâchement. (Figure 4)

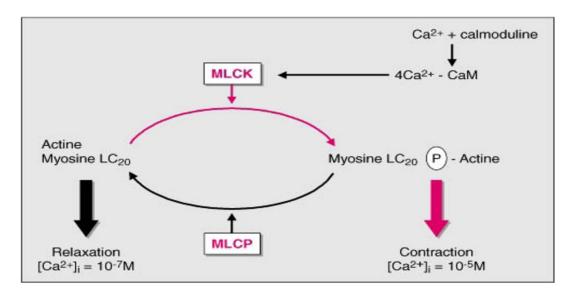


Figure 4 : Schéma illustrant la contraction et le relâchement musculaire.

Toutefois, ce processus peut être sujette à des changements en cas de troubles fonctionnels, parmi lesquels il y a le spasme qui est une contraction musculaire brusque, violente et involontaire.il s'agit en fait d'une hyperexcitabilité des muscles d'origine nerveuse qui se traduit par une tétanie musculaire. Cela se manifeste par des sensations douloureuses au ventre.

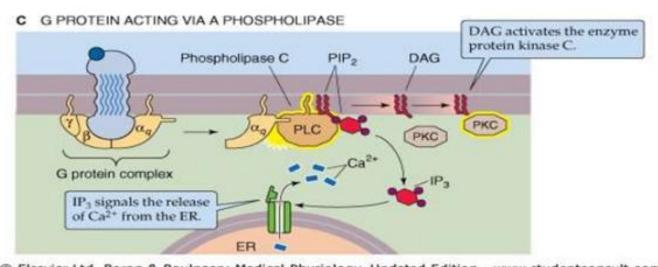
VI. Action de l'acétylcholine sur la contraction musculaire viscéral

L'acétylcholine provoque un spasme par dépolarisation, et de ce fait le muscle se contracte beaucoup plus (augmentation du tonus) et favorise l'augmentation du péristaltisme.

Il fait son action en se fixant sur son récepteur muscarinique, cette fixation entraine l'activation de la protéine G, ce dernier va activer la phospholipase (PLC) qui va catalyser l'hydrolyse de la PIP₂ en IP₃ et le DAG (seconds messagers de l'acétylcholine)

 IP_3 va activer la libération du calcium par le réticulum sarcoplasmique et le DAG va activer une protéine kinase c (PKC) qui va activer l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants.

Le calcium ainsi libéré par le réticulum sarcoplasmique se lie à la calmoduline pour former le complexe Ca²⁺-calmoduline qui va activer KCLM qui a son tour va phosphoryler les chaines légères de myosine (PCLM) et par conséquent les ponts seront démasqués causant de ce fait la formation du complexe actomyosine d'où une contraction (Figure 5) (Bolton 1979).



© Elsevier Ltd. Boron & Boulpaep: Medical Physiology, Updated Edition www.studentconsult.com

Figure 5 : Schéma illustrant le mode d'action de l'acétylcholine sur la cellule musculaire lisse par Boron & Boulpaep :Medical physiology,updated edition

VII. Matériel et méthodes

Produits chimiques à tester :

Les produits de synthèse destinés à l'expérimentation au laboratoire des molécules bioactives sont développés au département de chimie de la faculté de Dhar El Mahraz. Le nombre de produits à la base est de 10 et tous supposés miscibles dans le chloroforme ou le DMSO.

Toutefois, certains de ces produits voire la majorité après avoir été dissouts que cela soit dans du chloroforme ou le DMSO au contact du tyrode forment un précipité et rend de ce fait ce dernier non utilisable. Ces produits sont les suivantes :

K1, K3, K4, K6, K8, K10, K12, K7

Après un screening rapide de quelques-uns de ces produits, nous avons décelé un effet pharmacologique des produits RB1 et K13. Dans notre travail nous avons choisi d'explorer et d'approfondir l'étude de l'effet myorelaxant et spasmolytique relatif au produit K13 et surtout du produit RB1.

VIII. Effet Myorelaxant des produits de synthèse

Le but de cette expérience est de tester des produits de synthèse sur les contractions de base du jéjunum. Pour ce faire, sur un fragment d'intestin de lapin (le jéjunum), placé dans une cuve à organe isolé; on enregistre les contractions de base puis on ajoute le produit à des concentrations différentes et par ordre croissant.

VIII.1 Protocole expérimental

Sacrifice:

Le lapin mis à jeun depuis la veille, est sacrifié par exsanguination, l'abdomen est ouvert rapidement avec de gros ciseaux, un fragment d'intestin grêle du lapin (5cm) est isolé est vite placé dans un Tyrode froid afin de stopper toutes les réactions enzymatiques et de préserver l'énergie nécessaire pour permettre le redémarrage de la motricité du muscle lisse

La manipulation portera sur un petit fragment (2cm) de l'intestin grêle placé dans une cuve à organe isolé de 50 ml, remplie du Tyrode préalablement chauffé à 37°C grâce à un bain marie

Cette cuve peut être vidangée et remplie après chaque expérimentation. Le Tyrode est saturé en oxygène grâce à un aérateur.

VIII.2 Préparation de la solution de Tyrode normal

La composition du tyrode en g/l

NaCl: 8g/l KCl:0,201g/l MgCl₂: 0,101g/l NaHPO₄: 0,051g/l NaHCO₃: 0,99g/l

CaCl₂: 0,205g/l

Glucose : 1g/l Le tout dans 1litre d'eau bidistillée et le PH doit être ramené à 7,4.

A partir du tyrode préparé on va remplir la cuve (50 ml) et on vérifie que la température de la cuve est de 37°C

On prend le fragment d'intestin de 2cm et on accroche l'une de ses extrémités sur le crochet et on ligature l'autre extrémité avec un fil assez long pour le relier au levier du transducteur connecté à l'oscillographe (Harvard apparatus limited) qui permet d'enregistrer l'activité contractille de la préparation. Les segments dont les contractions apparaissent faibles sont écartés du protocole. Pour chaque essai, nous avons utilisé un nouvel segment de jéjunum.

IX. Effet spasmolytique des produits de synthèse

L'exploration d'un éventuel effet spasmolytique du produit K13 et RB1 ont été étudié après provocation d'un spasme par de l'ACh 10⁻⁵ M et/ou par le KCl (100 mM). Ce dernier est obtenu par un remplacement équimolaire du NaCl par KCl (Parekh et Brading, 1991; Delaey et al., 2007).

Afin d'évaluer si l'effet spasmolytique du RB1 implique un blocage des canaux calcique, le jéjunum a été placé dans une solution de Tyrode riche en potassium et exempte de Ca²⁺ et en présence de l'EDTA (2 mM) qui est un chélateur de Ca²⁺. Après l'abolition des contractions spontanées du jéjunum, le Ca²⁺ a été ajouté d'une manière cumulative en absence et en présence de RB1.

Le jéjunum a été placé dans une solution de Tyrode sans Ca²⁺ mais riche en KCl (100 mM) pendant 10 mn. L'addition de doses cumulatives de CaCl₂ (1-5 mM) a permis la réalisation de courbes dose-réponse traduisant la réactivité du jéjunum.

Des expériences similaires ont été répétées en présence d'une concentration submaximale de RB1 (300 $\mu g/mL$) ou en présence de vérapamil (1 μM), inhibiteur des canaux calciques voltage dépendant (Todorovic et al., 2004).

X. Résultats et discussion.

X.1 Etude des contractions spontanées du jéjunum.

Il faut généralement trente (30) minutes avant d'obtenir une reprise des contractions spontanées témoin de l'automatisme intestinal, le temps nécessaire au muscle de s'adapter à son nouvel environnement (figure 6).

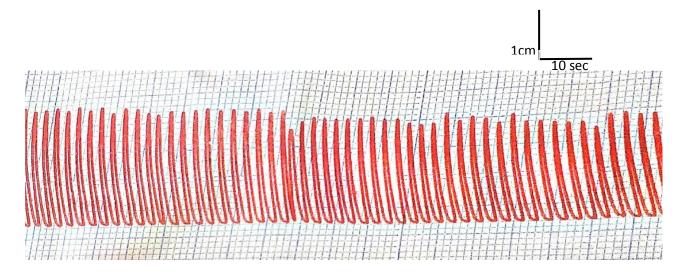


Figure 6 : contraction spontanée du jéjunum du lapin in vitro

On constate que le fragment de l'intestin placé dans un liquide physiologique (Tyrode) se contracte spontanément en dehors de toute innervation extrinsèque.

On peut expliquer cela par l'existence de cellules spécialisées : « les cellules interstitielles de Cajal » au niveau de l'intestin, ces cellules sont le siège de l'automatisme car elles possèdent une activité d'auto excitation (pacemaker) qui se propage aux autres cellules par des jonctions,

En plus elles assurent la dépolarisation des cellules musculaires lisses en ouvrant leurs canaux calciques "voltage dépendant". Cela est à l'origine des ondes lentes (OL). Ces OL déterminent un rythme électrique de base (REB).

X.2 Effet myorelaxant de K13 et RB1

Après enregistrement des contractions de base, on ajoute des concentrations du produit de synthèse K13 dans la cuve par ordre croissant. L'injection du produit K13 aux concentrations étudiées (3 ; 10 ; 30 ; 100 μg/ml) a induit une activité myorelaxante importante. Il s'est avéré que l'addition des concentrations croissantes et cumulatives de K13 entraine une réponse myorelaxante concentration dépendante, en effet l'injection da la concentration de 100 μg/mL

du produit K13 aboli complètement les contractions de base du jéjunum (voir tracé typique de la figure 7).

Quant au produit RB1 Il s'est avéré que l'addition des concentrations croissantes et cumulatives du RB1 (3 ; 10 ; 30 ; 100 ; 300 μ g/ml) entraine une réponse myorelaxante concentration dépendante avec une réponse maximale à la concentration de 300 μ g/mL (voir tracé typique de la figure 8).

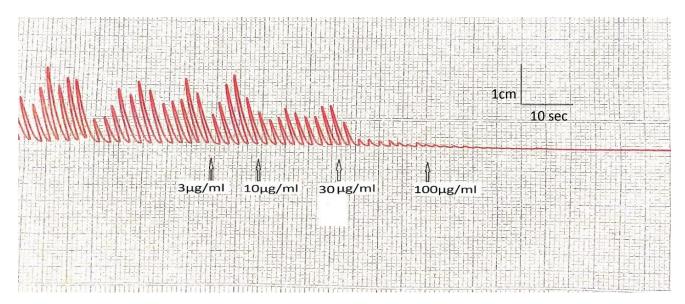


Figure 7 : Tracé original montrant l'effet myorelaxant concentration dépendante de K13 sur l'activité contractile spontanée du jéjunum du lapin

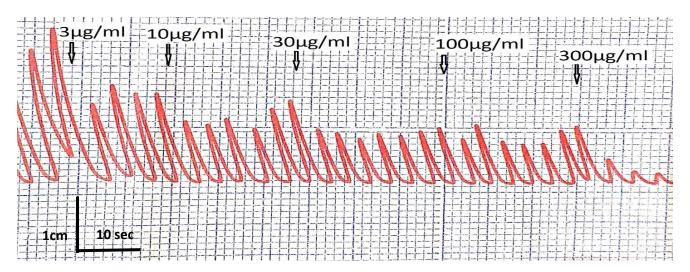


Figure 8 : Tracé original montrant l'effet myorelaxant de RB1 sur l'activité contractile spontanée du jéjunum du lapin

X.3 Comparaison de l'effet myorelaxant des deux produits

De façon générale le test de l'effet myorelaxant du K13 et RB1 montre que les deux produits possèdent un effet myorelaxant important toutefois la réponse myorelaxante du K13 était la plus puissante (tableau 1).

Tableau 1 : résume l'effet myorelaxant des deux produits étudiés n=1

Produits	Contraction de base	3μg/ml	10μg/ml	30μg/ml	100*μg/ml	300*μg/ml
K13	100%	61.29	61.29%	12.90%	0%	-
Rb1	100%	60%	48.57%	37.14%	25.71%	8.57%

Le screening pharmacologique des produits de synthèse testés sur les contractions de bases du jéjunum a permis de sélectionner deux produits à effet myorelaxant remarquable qui sont RB1 et K13. Cependant, pour les mêmes concentrations, le produit K13 donne un effet supérieur à celui de RB1. Donc, des deux produits testés, le K13 est le plus puissant.

X.4 Effet spasmolytique de RB1 et K13 sur le spasme induit par l'Acétylcholine (ACh)

Pour donner suite aux travaux du premier test (sur les contractions de base), nous avons décidé de tester RB1 et K13 sur le spasme provoqué par 10⁻⁵M de l'ACh. Pour ce faire, sur un fragment d'intestin de lapin (le jéjunum), placé dans une cuve à organe isolé, un spasme est provoqué par 10⁻⁵ M de l'acétylcholine puis on ajoute le produit (K13, RB1) à des concentrations cumulatives et par ordre croissant.

Les résultats obtenus montrent effectivement que le produit K13 possède également un effet spasmolytique concentration dépendante, en effet l'adjonction des concentrations de 3; 10; 30 et $100 \,\mu\text{g/mL}$ du K13 entraine un effet spasmolytique, la concentration maximale du K13 de $100 \,\mu\text{g/mL}$ inhibe complètement l'amplitude de la contraction induite par 10^{-5} M de l'ACh (voir tracé typique dans la figure 9 et figure 10).

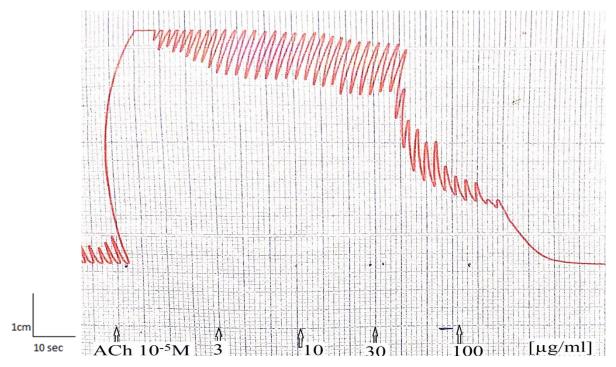


Figure 9 : Tracé original montrant l'effet de k13 sur le spasme induit par l'acétylcholine

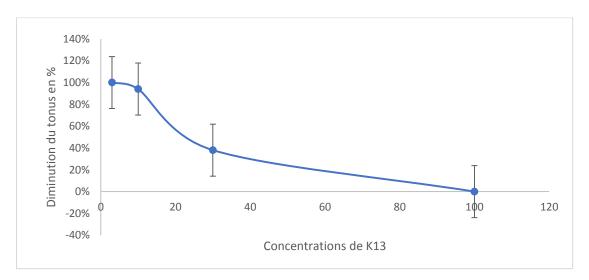


Figure 10 : Courbe représentant l'effet spasmolytique de K13 sur le spasme induit par l'ACh Les données sont représentées en moyenne ± écart type (n=2).

X.5 Effet de RB1

Nos investigations sur l'effet spasmolytique des produits étudiés montrent egalement que RB1 est doté d'effet spasmolytique contre l'augmentation du tonus musculaire induit par 10^{-5} M sur les segments du jéjunum isolés du lapin. L'injection du produit (RB1) aux concentrations étudiées a induit une activité spasmolytique importante. Il s'est avéré que l'addition des

concentrations croissantes du produit (RB1) de 3 μ g/mL à 1000 μ g/mL entraine une baisse concentration-dépendante de l'augmentation du tonus provoqué par l'ACh qui atteint 97 \pm 0.02% comme valeur maximale pour 1000 μ g/mL du produit (RB1) et 25 % comme valeur minimale pour la concentration de 3 μ g/mL (voir figure 12).



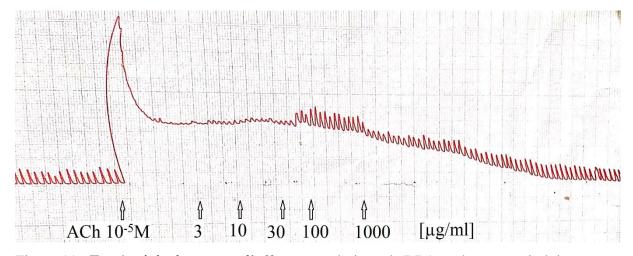


Figure 11 : Tracé original montrant l'effet spasmolytique de RB1 sur le spasme induit par 10^{-5} M de l'Acétylcholine.

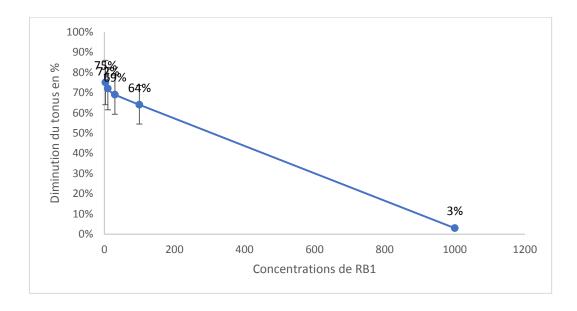


Figure 12 : Courbe représentant l'effet spasmolytique de RB1 sur le spasme induit par l'ACh

La diminution des contractions au fur et à mesure de l'augmentation des doses de RB1 ou de K13 prouvent que les deux produits donnent un effet spasmolytique. Mais l'effet du produit RB1 étant moindre par rapport à celui de k13 bien que les concentrations soient les mêmes pour les deux. Pour de faibles concentrations, le produit k13 donne plus vite de l'effet contrairement au produit RB1 pour lequel on doit augmenter la concentration.

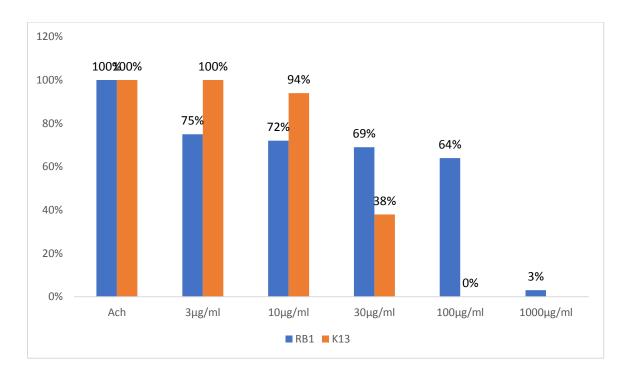


Figure 13: Histogramme comparant l'effet spasmolytique des deux produits (K13 et RB1)

X.6 Effet spasmolytique de RB1 sur le spasme induit par KCl

Faute de non disponibilité du produit k13 nous nous sommes limités à tester le RB1 sur le spasme induit par dépolarisation de la cellule musculaire lisse (CML) par une forte concentration du KCl (100mM). Le but de cette étude est de vérifier à la fois une éventuelle implication des canaux calciques voltages dépendant et /ou les canaux potassiques dans l'effet spasmolytique du RB1. En effet, l'incubation du jéjunum par une forte concentration du K⁺ provoque une dépolarisation et une augmentation du tonus de la CML consécutive à l'entrée du calcium extracellulaire à travers les canaux calciques sensibles à la dépolarisation, les

canaux calciques voltages dépendant (CCVD) Bolton et al, 1979; Bolton et al; 2004, sans oublier que la dépolarisation provoquée par le KCl empêche également un état d'hyperpolarisation (due à la restriction de l'efflux potassiques dans la CML) (Hamilton and Weston; 1989; Becker et al; 2001; Raeburn; 1991).

Les résultats obtenus montrent que l'effet spasmolytique du RB1 était moins important sur le spasme provoqué par 100mM de KCl (figure 14) que sur le spasme provoqué par 10⁻⁵M de l'ACh. En effet, la Figure 15 montre que RB1 inhibe l'action spasmodique induite par le KCl de 51%, et dans les mêmes conditions RB1 inhibe aussi l'effet spasmodique de l'acétylcholine (Figure 11) de 97%.

Cette différence de l'effet spasmolytique du RB1 contre le spasme induit par le KCl et l'ACh pourrait être expliquée par une éventuelle implication des canaux potassiques dans l'effet spasmolytique du RB1 en plus d'autres voies impliquées lorsque le spasme est induit par l'ACh tel qu'un blocage des canaux calciques voltages dépendants. A la différence du spasme induit par l'acétylcholine, le spasme provoqué par le KCl provoque une restriction de l'efflux potassique dans la CML, ainsi il est admis que la dépolarisation induite par le potassium provoque une inhibition de l'effet spasmolytique des produits dont leur effet est dû à l'activation des canaux potassiques (hyperpolarisation) (T.C.Hamilton and A.H.Weston; 1989; B. Becker et al; 2001; D Raeburn; 1991)

Nos résultats sont conformes à ceux de Raeburn and Brown (1991) et suggèrent qu'il y a au moins une implication d0es canaux potassiques dans l'effet spasmolytique du RB1. Néanmoins, d'autres études doivent être faites en utilisant des inhibiteurs spécifiques des canaux de K⁺ pour mieux caractériser une éventuelle implication de l'hyperpolarisation dans la réponse du RB1 tel que l'apamine, le charybdotoxin aussi bien que l'iberiotoxin pour inhiber les canaux Ca²⁺ dépendent du K+, le Glybenclamide, pour les canaux Triphosphate d'adénosine dépendants de K+, le tétraethyl ammonium ou le 4- aminopyridine, un inhibiteur du canal potassique voltage-dépendant.

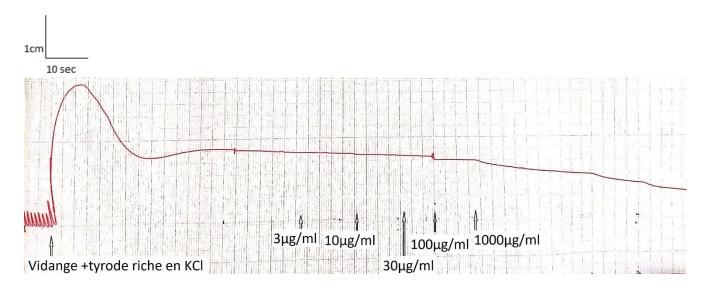


Figure 14 : Tracé original montrant l'effet de RB1 sur le spasme induit par KCl

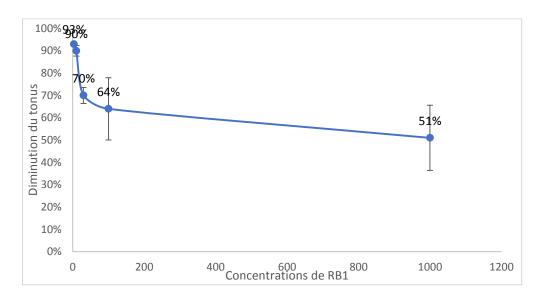


Figure 15 : Courbe représentant l'effet spasmolytique de RB1 sur le spasme induit par KCl. Les résultats sont représentés moyenne± écart type (n=3)

L'entrée du potassium à l'intérieur de la cellule provoque une augmentation du potentiel de la membrane due à la fermeture des canaux sodiques voltage dépendants ayant ainsi pour effet, une augmentation du tonus musculaire qui diminue après ajout de concentrations graduelles de RB1. La Figure 14 montre que RB1 inhibe l'action spasmodique induite par le KCl de 51%, et dans les mêmes conditions RB1 inhibe aussi l'effet spasmodique de l'acétylcholine (Figure 11) de 97%. A noter la diminution des contractions au fur et à mesure de l'augmentation des doses de RB1. Tout ceci démontre l'action antispasmodique significative de RB1.

X.7 Implication des canaux calciques voltages dépendants dans l'effet spasmolytique du RB1

Pour vérifier une éventuelle implication des canaux calciques voltages dépendants dans l'effet myorelaxant de RB1. Des expériences ont été menées sur des préparations pré contractés au KCl dans une solution sans calcium, et le calcium a été ajouté par la suite en absence et en présence du RB1.

La figure 16(A) représente les contractions induites par le Tyrode riche en KCl (100mM) déplété de calcium après ajout de concentrations croissantes de calcium (contrôle). Afin de vérifier l'incrimination des canaux calciques voltages dépendants dans l'effet du RB1, d'autres courbes concentrations réponses ont été réalisées dans les mêmes conditions en présence du vérapamil (1µM), inhibiteur spécifique des canaux calciques voltages dépendants ou en présence d'une concentration submaximale du RB1 (300µg/ml). La figure 16(B) (tracé typique RB1) nous montre que l'incubation des préparations en présence RB1 déplace la courbe des contractions induites par le KCl (100 mM) observés dans la réponse contrôle (tracé typique contrôle, figure 16) vers la droite (inhibition). Des résultats similaires ont été observé en présence du vérapamil utilisé comme contrôle positif (tracé typique, figure 16 C). (A titre d'exemple 5 mM du calcium extracellulaire dans le groupe contrôle entraine une augmentation du tonus de 6 cm, cependant cet effet a été diminué en présence de RB1 (3.5 cm) et en présence du vérapamil (2.5 cm) en utilisant les mêmes conditions (tyrode riche en potassium sans calcium). Ce résultat montre l'effet de RB1 ressemble fortement à celui du vérapamil et suggère que l'effet spasmolytique de RB1 impliquerait aussi la restriction de l'influx des ions Ca²⁺ par le blocage des canaux Ca²⁺ voltages-dépendants.

Tenant en compte les résultats précédents, on peut considérer que l'effet du RB1 pourrait également être dû à des mécanismes synergiques tels qu'une hyperpolarisation observée (lors de l'expérience du KCl) qui sera responsable de l'inhibition des canaux calciques voltages dépendant dans l'effet spasmolytique du RB1.

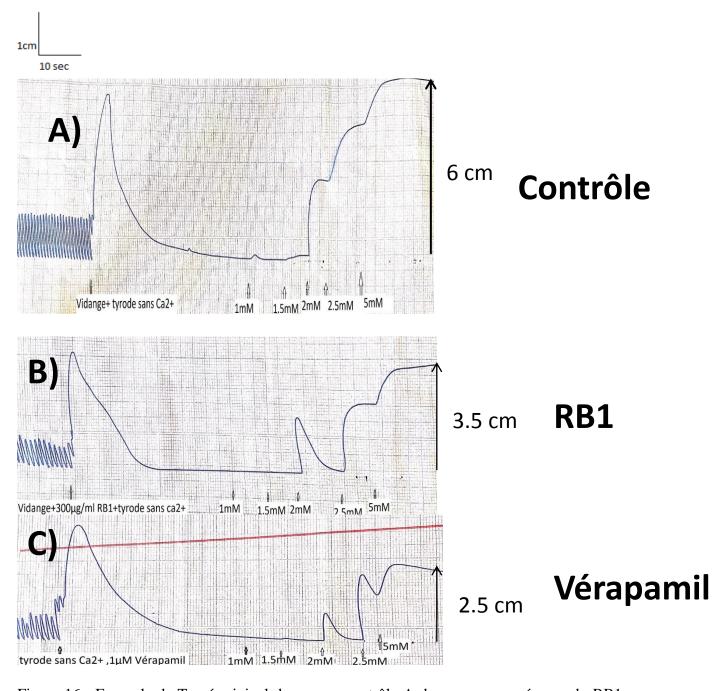


Figure 16 : Exemple de Tracé original du groupe contrôle A du groupe en présence du RB1 (B) et du groupe en présence du vérapamil (C) respectivement montrant la réponse Concentration dépendante du calcium extracellulaire après incubation de la préparation dans le Tyrode riche en KCl exempté de calcium. RB1 et le vérapamil déplace la courbe des contractions induites par le KCl (100 mM) observés dans la réponse contrôle

X.8 Etude comparative entre les deux produits (RB1, Vérapamil)

Avec le RB1

On réalise la même expérimentation avec du tyrode sans calcium et riche en KCl, en présence de 300 μ g/ml de RB1 ou de 1μ M de Vérapamil, puis on on rajoute dans la cuve les concentrations croissantes de calcium..

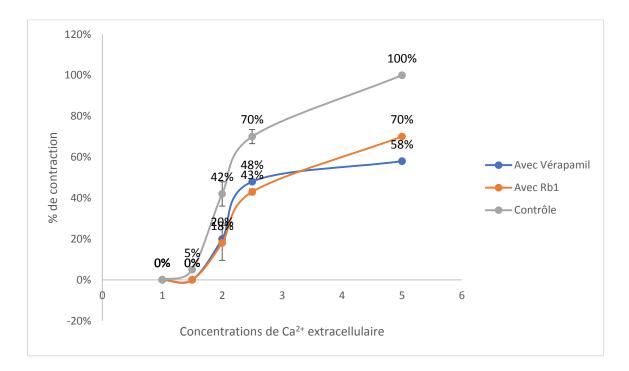


Figure 17 : Etude comparative des effets des deux produits sur les canaux calciques.

Afin de vérifier l'implication des canaux calciques voltages dépendants dans l'effet de RB1, plusieurs courbes concentrations réponses ont été réalisées dans les mêmes conditions en présence du vérapamil (1µM), inhibiteur spécifique des canaux calciques voltages dépendants ou en présence d'une concentration maximale de 300µg/ml de RB1.

La figure 17 nous montre que l'incubation des préparations en présence soit du vérapamil soit de RB1 déplace la courbe des contractions induites par le KCl vers la droite. Ce résultat montre que l'effet de RB1 ressemble à celui du vérapamil et suggère que l'effet spasmolytique de RB1 impliquerait une restriction partielle de l'influx des ions Ca²⁺ par le blocage partiel des canaux Calciques voltage-dépendants.

XI. Conclusion

L'ensemble de nos travaux ont montrés que :

- Les produits K13 et RB1 entrainent une myorelaxation des segments du jéjunum qui se manifeste sous forme d'une baisse des contractions spontanées de façon dose dépendante, et une action spasmolytique du fait qu'il entraine la chute du spasme induit par l'acétylcholine (10⁻⁵M) et le chlorure de potassium (100mM) pour le RB1. Car faute de non disponibilité du produit K13 nous nous sommes limités qu'à tester l'effet du produit RB1.
- Les effets myorelaxant et spasmolytique de RB1 seraient dû au moins au blocage partiel de l'influx calcique dans les cellules musculaires jéjunales par inhibition des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD). En effet, l'incubation des segments du jéjunum en présence de RB1 dans du tyrode riche en KCl et exempt de Ca²⁺ a décalé la courbe Ca²⁺ réponse vers la droite. De même avec le vérapamil qui est un inhibiteur des CCVD, Cette similitude au niveau des effets de ces deux produits là suggère que l'effet spasmolytique et myorelaxant de RB1 passe vraisemblablement par la restriction de l'influx des ions Ca²⁺au niveau des canaux calciques voltages dépendants.

Somme toute, ce travail propose un produit de synthèse à effet spasmolytique dont son action est similaire en partie à celui du vérapamil qui pourrait être utiliser dans les pathologies intestinales tels que la colite spasmodique (contractions douloureuses, ballonnements, troubles du transit), la spasmophilie (crampes abdominales, ballonnements, gaz).

XII. Références

B. Becker, 1 M.-H. Antoine, 1 Q.-A. Nguyen, 2 B. Rigo, 3 K.E. Cosgrove, 3 P.D. Barnes, 3 M.J. Dunne, 4 B. Pirotte & *,1P. Lebrun Synthesis and characterization of a quinolinonic compound activating ATP-sensitive K+ channels in endocrine and smooth muscle tissues. British Journal of Pharmacology (2001) 134, 375 385

Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. Physiol Rev. Jul; 59(3): 606-718, 1979

BoltonTB, Gordienko DV, Povstyan OV, Harhun MI and Pucovsky V. Smooth muscle cells and interstitial cells of blood vessels. Cell Calcium, 35: 643-657, 2004.

D Raeburn and T J Brown. RP 49356 and cromakalim relax airway smooth muscle in vitro by opening a sulphonylurea-sensitive K+ channel: a comparison with nifedipine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics February 1991, 256 (2) 480-485;

http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/histo1an03-07tissu_musculaire.pdf

Samuel ESTRADA-SOTO1, Dalia GONZÁLEZ-MALDONADO1, Patricia CASTILLO-ESPAÑA2, Francisco AGUIRRE-CRESPO3, Juan Carlos SÁNCHEZ-SALGADO1 Spasmolytic effect of Mentha pulegium L. involves ionic flux regulation in rat ileum strips 1 Facultad de Farmacia; 2Centro de Investigación en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México 3 División Ciencias de la Salud, Universidad de Quintana Roo, México Received November 11, 2009; Accepted March 1, 2010

T.C.Hamilton¹A.H.Weston² Cromakalim, nicorandil and pinacidil: Novel drugs which open potassium channels in smooth muscle <u>Volume 20</u>, <u>Issue 1</u>, 1989, Pages 1-9