

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

---

**Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,  
Sciences de la Terre et de l'Univers**

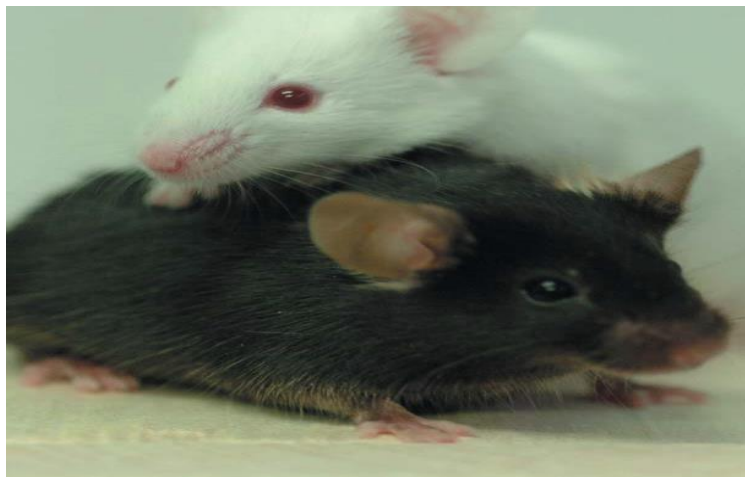


**Département de Biologie**

*Production pédagogique*

**Modèles d'étude et d'expérimentation en physiologie**

*Polycopié destiné aux étudiants en Licence et Master*



**Dr MALTI BOUDILMI Nassima Amel**

## **Master 2 Physiologie cellulaire et Physiopathologie (S3)**

**UE1, code MEP**

### **Contenu de la matière :**

#### **Partie 1 : Cours**

- I. Complexité des organismes multicellulaires
- II. Modèles expérimentaux et choix
- III. Règlements en animalerie et en expérimentation sur animal.
- IV. Systèmes modèles expérimentaux
- V. Perspectives de modélisation du vivant ; développement de stratégies de modélisation.

#### **Partie 2 : Travaux dirigés**

#### **Objectifs de l'UE :**

- Sensibiliser les étudiants à la notion d'espèces ou de systèmes modèles;
- Les amener à réfléchir sur l'importance du choix du modèle par rapport aux phénomènes étudiés (Plusieurs exemples sont choisis dans les domaines de la physiologie cellulaire et de la physiopathologie animale).
- Recenser les problèmes éthiques soulevés par l'expérimentation sur animal et par la création d'OGM;
- Comprendre la nécessité de développer des stratégies de modélisation pour la recherche et dans les secteurs industriels de la biopharmacie, de la cosmétique et de la pharmacotoxicologie;
- Emploi et sélection de modèles animaux en recherche biomédicale;
- Identification, maîtrise, et suivi des variables (*expérimentales et non expérimentales*) qui influencent la réponse d'un modèle animal à une expérience donnée.

## Parti 1/ Cours

### Chapitre 1 : Complexité des organismes multicellulaires

#### ❖ Organisme vivant ?

- Un organisme vivant (grec *organon*, « instrument »), est en biologie, un système vivant complexe et organisé.
- Constitué d'une ou plusieurs cellules vivantes (organisme unicellulaire ou multicellulaire).
- Les organismes vivants sont classifiés en "espèces" partageant des caractéristiques génétiques, biologiques et morphologiques communes.

#### ❖ Les organismes multicellulaires ?

- Les organismes complexes multicellulaires sont constitués d'un ensemble de cellules vivantes différenciées, assurant des fonctions spécialisées et opérant de manière concertée.
- Ces cellules dérivent en général d'une progénitrice unique et partagent le même patrimoine génétique.
- Elles interagissent de façon à fonctionner comme un ensemble stable dynamiquement.

#### ❖ Equilibre dynamique: Homéostasie

- Organisme vivant est dans un *état thermodynamique de non-équilibre*, mais conservant un environnement interne quasi-constant, grâce à l'apport continu d'énergie et, le cas échéant, de *nutriments*.
- Système est en **équilibre thermodynamique**: à la fois en équilibre *thermique, mécanique et chimique* (déterminé par les valeurs de ses paramètres intensifs, comme la *pression* ou la *température*).

#### ❖ Diversité des modèles d'études en physiologie

Les organismes vivants pris dans leur diversité sont des structures très complexes et très intégrées.

- Régulations et leurs interactions
- Attention aux interférences

Afin de comprendre les mécanismes fondamentaux du vivant, la recherche est donc amenée à mettre au point des **systèmes expérimentaux**; dits « **Organisme modèles** » et ce dans le but de:

- ❑ Isoler les phénomènes étudiés en **simplifiant le modèle**, réduisant l'organisme à un organe, un tissu, voire une cellule ou un compartiment cellulaire
- ❑ Créer de **nouveaux modèles** (lignées mutantes ou transgéniques) pour comprendre la fonction des gènes et leur régulation.

❖ **Le recours à l'expérimentation animale :**

- **L'expérimentation animale** a participé depuis l'antiquité à l'amélioration des conditions de vie de l'homme et au début du 20ème siècle, à l'essor de la médecine moderne. Elle demeure encore une nécessité absolue dans bien des domaines de la recherche biologique et médicale : **l'animal est un partenaire indispensable** de la recherche.
- Certaines expériences sur l'animal peuvent parfois ne plus être justifiées grâce à la mise au point et au développement de méthodes alternatives - substitutives - excluant tout recours à l'animal ; cependant, ces méthodes ne peuvent pas supplanter toutes les expérimentations ayant recours à l'animal. Ainsi le nombre d'animaux utilisés pour l'expérimentation diminue en raison de l'amélioration des protocoles, des progrès sanitaires en matière de production d'animaux de laboratoire (notamment pour les rongeurs et les lapins), et de la mise en œuvre des techniques alternatives, en particulier les cultures cellulaires. Les rongeurs et les lagomorphes représentent plus de 90% des animaux utilisés en expérimentation animale.

❖ **Les questions préalables que doit se poser l'expérimentateur :**

- ✓ La pertinence de la recherche
- ✓ La nécessité absolue de recourir à un modèle animal
- ✓ Le bon choix du modèle animal envisagé
- ✓ Le nombre d'animaux nécessaires
- ✓ La fiabilité du protocole expérimental établi
- ✓ Le respect de l'éthique, le bien-être des animaux ainsi que les conditions d'expérimentation sont des facteurs influençant la qualité des résultats.

## Chapitre 2 : Modèles expérimentaux et choix

Dans sa forme actuelle, l'expérimentation animale consiste à analyser le fonctionnement des systèmes biologiques du règne animal à partir d'observations sur un matériel vivant. Elle est soumise à la même organisation que toute expérimentation sur végétaux ou sur un matériel inerte, mais s'en distingue par le fait que le sujet expérimental est pourvu d'un système nerveux, et qu'il peut donc être doué de sensibilité. Cette sensibilité des animaux peut s'exercer à l'égard des conditions dans lesquelles ils sont placés lors d'une expérimentation, ce qui autorise à parler de contraintes imposées à l'animal. Ces contraintes et les réponses émotionnelles des animaux posent deux questions majeures : la validité de l'expérimentation comme mode d'analyse du fonctionnement des animaux et la légitimité de l'utilisation d'un être vivant sensible. De plus, comme pour les végétaux, l'utilisation des animaux peut poser la question de la survie de l'espèce.

❖ **Définition:** selon L'American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging :

*« En recherche biomédicale, un modèle animal est un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales. »*

❖ **Modèles animaux en recherche biomédicale**

### 1. Modèles naturels ou « spontanés »

- Maladies ou conditions présentes naturellement chez les animaux et identiques à des maladies ou affections humaines: *le diabète, l'hypertension, l'arthrite et les déficits immunitaires.*
- Des centaines de souches et de stocks d'animaux atteints de maladies héréditaires sont caractérisés et conservés.
- Le laboratoire *Jackson* détient l'une des plus grandes collections de ces précieux modèles animaux (les souris).

### 2. Modèles expérimentaux

Modèles chez lesquels les scientifiques reproduisent expérimentalement une affection ou une maladie:

- La *streptozotocine* est une substance chimique qui permet de provoquer le diabète en endommageant les cellules productrices d'insuline du pancréas;
- Produire un certain type de cancer à l'aide d'un *cancérogène chimique*;
- Déclencher un AVC *chirurgicalement*.

### **3. Modèles génétiquement modifiés** (modèles *knock-out*)

- Groupe particulier de modèles expérimentaux dont on a manipulé le code génétique pour provoquer une maladie.
- Dans le génome des animaux génétiquement modifiés, on a inséré un ADN étranger, ou bien certains gènes ont été remplacés ou neutralisés;
- Ces modèles permettent l'étude du fondement génétique de certaines maladies, la susceptibilité ou la résistance à celles-ci.

**4. Modèles négatifs:** Certains animaux sont *résistants* à une affection. En étudiant les *causes* de cet état, on peut trouver des indices sur la résistance à la maladie et ses fondements physiologiques.

**5. Modèles orphelins:** Affections apparaissant naturellement chez un *animal* et pour lesquelles il *n'existe pas d'équivalent chez l'humain* (La tremblante du mouton constitue un modèle utile pour l'étude des encéphalopathies spongiformes humaines dont on entend si souvent parler (ESB ou « maladie de la vache folle »).

#### ❖ **Que demande-t-on à un modèle?**

- L'espèce et le modèle convenant le mieux à une recherche donnée peuvent être identiques à ceux qui ont déjà été sélectionnés par d'autres chercheurs pour des travaux du même type.
- Cependant le chercheur devra effectuer son choix en tenant compte du nombre croissant de modèles animaux qui sont créés, y compris les nouvelles mutations spontanées et les animaux génétiquement modifiés.

#### ❖ **Facteurs influençant le choix du modèle animal :**

- Modèles naturels par opposition à expérimentaux: Les modèles naturels et artificiels de maladie peuvent être utiles selon les objectifs de l'étude envisagée;
- Réponses de l'animal aux procédures;
- Aspects environnementaux importants pour ce modèle;
- Disponibilité de l'espèce et des données générales sur le modèle en particulier;
- Nombre nécessaire pour que l'expérience soit statistiquement valide;

## **Chapitre 3 : Règlements en animalerie et en expérimentation animale**

**1. Rôle et responsabilité du personnel :** Importance des « Influences » exercées par les personnes participant à un projet de recherche sur la réponse d'un modèle animal à une expérience :

- Personnel de soins aux animaux,
- Directeurs (de recherche et de l'animalerie),
- techniciens en recherche,
- Chercheurs (étudiants et doctorants),
- Vétérinaire de l'animalerie.

### **❖ Responsabilités du chercheur principal :**

- ✓ Envisager et maîtriser toutes les variables non expérimentales pertinentes; et les résumer à toute l'équipe;
- ✓ Déterminer et maîtriser toutes les variables expérimentales soient conformément aux procédés normalisés de fonctionnement (PNF);
- ✓ Assurer le suivi et l'enregistrement des mesures des variables (conformément aux procédés normalisés de fonctionnement);
- ✓ Vérifier l'état de santé des animaux avant de les acheter et assurer le suivi de leur état de santé;
- ✓ Se conformer à tous les PNF de l'institution visant à limiter l'introduction de maladies.

### **❖ Responsabilités du directeur de l'animalerie :**

- ✓ Veiller à ce que les paramètres environnementaux de l'animalerie soient maintenus à des niveaux appropriés et uniformes;
- ✓ Veiller à la qualité de la formation et de l'expertise en matière de soins aux animaux;
- ✓ Vérifier l'état de santé des animaux avant de les acheter et que le suivi de l'état de santé soit effectué conformément aux règles de l'institution;

### **❖ Responsabilités des étudiants diplômés et au niveau post-doctoral et des techniciens en recherche :**

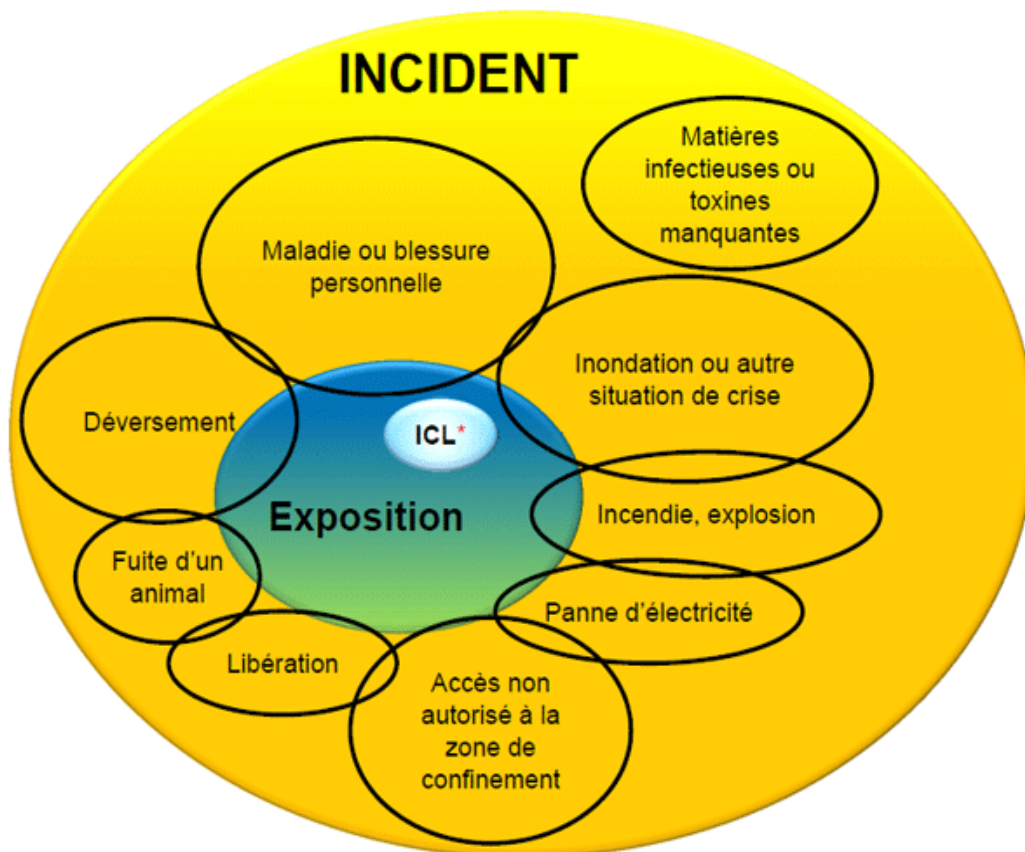
- ✓ Effectuer le suivi et l'enregistrement des mesures de toutes les variables;
- ✓ Exécuter toutes les procédures expérimentales conformément aux procédés normalisés de fonctionnement (PNF);
- ✓ Manipuler les animaux à l'aide des techniques appropriées;

- ✓ Se conformer à tous les PNF de l'institution visant à limiter l'introduction de maladies.

❖ **Responsabilités du personnel de soins aux animaux (1) et du vétérinaire du laboratoire (2) :**

- ✓ (1) Effectuer toutes les opérations quotidiennes de routine de l'animalerie de façon uniforme et conformément aux procédés normalisés de fonctionnement;
- ✓ Effectuer toutes les manipulations de soins aux animaux de façon uniforme, avec douceur et sans cruauté.
- ✓ (2) Veiller à l'état de santé des animaux et formuler les recommandations pertinentes;
- ✓ Exécuter les procédures visant à maintenir les animaux en bonne santé.

## 2. Risques liés à la manipulation des animaux



### Incidents, expositions et intoxications et infections contractées en laboratoire (ICL)



### ➤ **Morsures et griffures**

- Adopter un mode de préhension de l'animal (façon de prendre et maintenir) adapté à l'espèce; geste présentant des risques !!!
- L'animal peut s'échapper ou risque de mordre ou de griffer:
  - barrer les issues,
  - ne pas affoler l'animal (grâce à son identification, pourra être remis dans sa cage
  - mis en quarantaine passagère: s'est souillé ou blessé...

Les morsures et griffures constituent des voies d'entrées d'agents pathogènes portés par l'animal.

### ➤ **Allergies:**

- anesthésiant, produit chimique;
- produits animaux qui génèrent réactions de sensibilisation:
  - aux sécrétions et poils de certaines espèces animales (rats, souris, lapins...)
  - aux poussières des litières
  - La chaleur animale génère des courants convectifs entraînant d'importants mouvements d'air (ex. locaux sont surpeuplés).
- L'empoussièremement d'une animalerie, sa richesse en protéines et son antigénicité sont en corrélation avec l'importance de la population animale hébergée. Le nettoyage des cages doit être effectué dans une laverie par des procédés humides.
- La prévention du risque allergique porte sur les moyens de protections individuelle et collective: minimiser les effets dus aux aérosols, au contact avec l'allergène et à l'empoussièremement
- Les mesures: nombre de changes des litières, état sanitaire des animaux, nettoyage et d'entretien des locaux et des matériels.

### ➤ **Zoonoses**

- Les animaux de laboratoire peuvent être porteurs de maladies d'origine virale, bactérienne ou parasitaire, apparentes ou inapparentes, connues ou inconnues.
- Lorsque ces maladies sont pathogènes pour l'Homme elles sont appelées zoonoses.
- Les germes incriminés peuvent ne pas être pathogènes pour l'animal ou provoquer des symptômes différents chez l'Homme.
- La manipulation d'animaux (même a priori sains), peut présenter des risques infectieux.

### 3. Les différentes voies de contamination

#### ➤ Voie transcutanée :

- Morsures, griffures
- Piqûres lors de soins, d'inoculations, de prélèvements (seringues et aiguilles)
- Peut éventuellement se traduire par une septicémie

➤ **Voie oculaire** : par projection dans les yeux ou dépôt sur l'œil d'aérosols ou de poussières de litière.

➤ **Voie digestive** : par ingestion (toxoplasmose ou salmonellose).

➤ **Voie respiratoire** : par inhalation d'aérosols infectieux (tuberculose, pneumonies atypiques).

### 4. Risques liés à l'expérimentation

#### ❖ Utilisation des anesthésiques:

- Le personnel doit être averti des risques d'interactions chimiques éventuelles entre les anesthésiques médicamenteux et d'autres produits chimiques administrés aux animaux. ex :
  - certains barbituriques sont des inducteurs enzymatiques du métabolisme de l'halothane et accroissent la toxicité hépatique de cet organohalogéné).
  - ces interactions peuvent aussi concerner l'expérimentateur, s'il suit un traitement médicamenteux.
- Les risques encourus par l'expérimentateur (toxicité, toxicomanie) relèvent plus des expositions minimales répétées que des expositions uniques importantes.
- La plupart des manipulations effectuées sur l'animal de laboratoire se fait à l'aide d'anesthésiques lui évitant stress et douleur (à l'exception des injections ou prélèvements indolores)

□ L'anesthésie par **inhalation** peut être :

- le meilleur choix pour le rat: avec un appareil d'anesthésie approprié (la moins toxique et la plus facile à mettre en œuvre)
- utilisée efficacement chez les ruminants (mais exclure le protoxyde d'azote, effet une tendance naturelle au météorisme)
- Le protocole d'anesthésie sera sélectionné au moment du choix du projet expérimental en fonction de:
  - l'espèce animale considérée

- diverses conditions (poids, sexe, état nutritionnel, ..... etc)
- de la profondeur et de la durée de l'effet recherché

## ❖ Principaux produits anesthésiques utilisés en expérimentation animale :

### 1. Anesthésiques injectables

- Barbituriques : méthohéxital sodique (Brietal), pentobarbital sodique, thiopental sodique (Pentothal)
- Cholinergiques : atropine, glycopyrrolate (Robinul)
- Morphinomimétiques : alfentanil (Rapifen), pethidine (Dolosal), fentanyl, morphine
- Tranquillisants type benzodiazépine : diazepam (Valium), propofol (Diprivan), étomidate (Hypnomidate), xylazine (Anased, Rompun) : utilisés lors d'une sédation modérée

### 2. Anesthésiques volatils

- Halogénés volatils (desflurane, enflurane, isoflurane, méthoxyflurane, ...): petits animaux (avec appareils d'anesthésie à débit variable, vaporisateurs et chambres d'inhalation);
- Oxyde de diéthyle (éther éthylique): risques importants d'incendie et d'explosion; entreposé dans le local de stockage des produits chimiques. Les cadavres d'animaux euthanasiés à l'éther: stockés dans des congélateurs sécurisés (son utilisation doit être évitée);
- Chloroforme: hépatotoxique et classé cancérigène pour l'homme (son utilisation doit être proscrite)

### ➤ Utilisation de produits chimiques cancérigènes, mutagènes ou toxiques pour la reproduction (CMR)

- L'administration de ces produits aux animaux est soumise à la réglementation relative à la prévention du risque chimique. Les lieux où sont manipulés ces produits doivent être balisés ainsi que les cages des animaux.
- Pour les produits reconnus cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques (C/M/R), il faut prévoir la délimitation et le balisage des zones à risque (voir document Risque Chimique).

### ➤ Manipulation de produits radioactifs

- Cela exige d'avoir une bonne connaissance des règles de radioprotection, de confiner le risque dans des locaux prévus à cet usage et balisés.

- Il est important que l'ensemble du personnel manipulant des animaux à qui il a été injecté un produit radioactif, ait reçu une formation, dispose d'un contrôle dosimétrique (dosifilm et examen radiotoxicologique urinaire) et d'un suivi médical.

➤ **Infection expérimentale par des agents pathogènes ou OGM:**

- Lors de dissémination de ce microorganisme par l'animal (urine, production d'aérosols...) contaminant les cages, les litières, les biberons
- Lors d'une mutation ou d'une recombinaison du microorganisme modifié avec un microorganisme normalement porté par l'animal
  - L'importance des risques dépend de la classe de risque du microorganisme / l'OGM répartis en classes de risque (2, 3 ou 4).
  - Ces classements dictent le niveau de confinement de l'animalerie.

Les autres règles de préventions sont analogues à celles adoptées pour se protéger des zoonoses.

➤ **La prévention contre le risque biologique :**

- **La protection collective :** locaux ventilés, des armoires ventilées, la séparation des zones en fonction du niveau de risque biologique,
- **La protection individuelle :** port de blouse / surblouse, de surchausses, de charlotte, de gants, de masque...
- **Les bonnes pratiques:** respect des recommandations et des consignes pour la plupart inscrites dans le règlement intérieur de l'animalerie. Ex: acheter des **animaux** d'état sanitaire satisfaisant à des fournisseurs agréés.

➤ **Risques spécifiques :**

- **Port de charges :** La manipulation quotidienne des cages, des sacs de litières, du matériel...constitue pour le personnel animalier une contrainte physique importante (troubles musculo-squelettiques non négligeables). Si elle ne peut pas tout à fait être supprimée, l'organisation du travail et l'achat de matériel facilement transportable, doivent être privilégiés.
- **Utilisation de l'autoclave, machine à laver...**
  - ✓ Les appareils de la laverie génèrent une atmosphère chaude et humide gênante pour le personnel: ventilation adaptée.
  - ✓ Ne jamais ouvrir un autoclave avant la fin totale du cycle (les vieux appareils ne répondent pas aux normes de sécurité : attention au jet de vapeurs brûlantes).

✓ L'utilisation des machines à laver: veiller à ce qu'il n'y est jamais de rejet des produits utilisés, adapter des systèmes de ventilation évitant l'inhalation répétée de produits chimiques détergents.

✓ **Agents pathogènes classés en fonction de leur sensibilité relative aux désinfectants chimiques**

✓  
✓

Sensibilité	Agent pathogène	Désinfectants avérés efficaces
Extrêmement résistants	Prions	Fortes concentrations d'hypochlorite de sodium (NaOCl) ou solutions chaudes d'hydroxyde de sodium (NaOH) de fortes concentrations
Très résistants	Oocystes de protozoaire	Hydroxyde d'ammonium, halogènes (fortes concentrations), phénols halogénés
	Endospores bactériennes	Certains acides, aldéhydes, halogènes (fortes concentrations), composés peroxygénés
Résistants	Mycobactéries	Alcools, aldéhydes, certains alcalis, halogènes, certains composés peroxygénés, certains phénols
	Virus non enveloppés	Aldéhydes, halogènes, composés peroxygénés
Sensibles	Spores fongiques	Certains alcools, aldéhydes, biguanides, halogènes, composés peroxygénés, certains phénols
	Bactéries Gram négatif	Alcools, aldéhydes, alcalis, biguanides, halogènes, composés peroxygénés, certains phénols, certains composés d'ammonium quaternaire (CAQ)
	Bactéries Gram positif	
Virus enveloppés		
Très sensibles	Mycoplasmes	Acides, alcools, aldéhydes, alcalis, biguanides, halogènes, composés peroxygénés, phénols, CAQ

✓

## ➤ Mesures de sécurité

### ❖ *Bonnes pratiques :*

- maintenir la quarantaine (selon temps de latence de la maladie suspectée et l'espèce)
- manipuler les litières en évitant la création d'aérosols
- porter des lunettes (masque), des gants en latex lors de manipulation d'animaux infectés (autopsie, manipulation de prélèvements)
- se laver les mains avant de quitter les locaux et pour les animaliers se doucher en sortie
- Suivi médical (vaccinations, visite médicale, suivi particulier des femmes enceintes toxoplasmose, listériose, brucellose, sont à risques pour le devenir de la grossesse ou du fœtus)

### ❖ *En cas d'Incident :* toute situation défectueuse, tout dysfonctionnement, susceptible d'entraîner une source de danger pour le personnel et/ou pour les animaux

- personnel : inscrire sur le registre d'hygiène et de sécurité,
- animaux : inscrire sur le registre de l'animalerie.

### ❖ *En cas d'Accident :* fait accidentel caractérisé par l'apparition soudaine d'une lésion (visible ou non) de l'organisme ( morsure, piqûre, brûlure, coupure...); doit faire l'objet d'une déclaration de service (cas des fonctionnaires) ou de travail (pour les agents non titulaires).

### ❖ *Conduite à tenir :*

- ✓ Prévoir des mesures simples, validées et connues de tous en cas d'accident relatif à une situation accidentelle mettant en cause les animaux et/ ou le personnel (évacuation, inaccessibilité des lieux, etc.)
- ✓ Pour le travail expérimental en animalerie, il existe d'autres conduites à tenir en cas de : Brûlures thermiques et chimiques
- ✓ **Dans tous les cas**, il convient de faire une déclaration d'accident auprès de l'employeur ou de l'organisme de rattachement et de l'inscrire sur le registre hygiène et sécurité.

### ❖ *Vaccination du personnel :*

- **Vaccin antirabique:** Toute personne exposée à des animaux susceptibles d'être atteints de la rage doit envisager de se faire vacciner contre cette maladie. Tous

les animaux qui sont amenés dans les animaleries et qui sont susceptibles d'avoir été exposés à la rage doivent être considérés comme à risque. De façon générale, il s'agit de tous les animaux domestiques qui ont été hébergés à l'extérieur (y compris les animaux de ferme et à fourrure), des chiens et des chats d'origine inconnue et de tous les animaux sauvages. Les institutions peuvent recommander que tous les employés devant travailler avec ces espèces aient été vaccinés contre la rage.

- **Vaccin antitétanique:** Pour réduire les risques d'infection associés à toutes les plaies perforantes (morsures d'animaux, piqûres d'aiguilles), toute personne employée dans une installation d'animaux d'expérimentation doit avoir reçu un vaccin antitétanique à jour.
- **Autres vaccins:** Selon l'espèce visée (p. ex. primates non humains), d'autres vaccins peuvent être recommandés en vertu du programme de santé et sécurité. L'institution doit tenir des dossiers faisant état des vaccins reçus par tous les employés.

## Problèmes éthiques liés à l'expérimentation animale

### ❖ Terminologie :

- Science morale ; discipline philosophique pratique et normative (règles) dans un milieu naturel et humain; comment les êtres humains doivent se comporter, agir et être, entre eux et envers ce qui les entoure: *bioéthique, éthique de l'environnement, éthique des affaires ou éthique de l'informatique.*
- Dans tous les cas, l'éthique vise à répondre à : Comment agir au mieux ?

### ❖ L'éthique de l'expérimentation animale :

- Au-delà du fait que le stress et la souffrance peuvent perturber les résultats obtenus, la sensibilité de l'animal pose la question de la des limites d'utilisation des animaux. Les études sur les animaux sont actuellement indispensables en recherche biologique et médicale pour des raisons scientifiques, légales et éthiques.
- Mais, l'homme a-t-il le droit d'utiliser des animaux pour des fins scientifiques ?

### ❖ Le principe des 3R (Russel et Burch, 1959) : « *Replace, reduce and refine* »

- Ce principe dit qu'avant toute expérimentation animale, une réflexion doit permettre de vérifier la possibilité de **remplacement** ou de **réduction** de l'étude, ainsi que les moyens d'en **améliorer** la réalisation pour les animaux.
- *Bienveillance*: Ensemble des soins donnés aux animaux qui visent à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux: les animaux sont des êtres vivants et sensibles. Une considération particulière leur est due.

### ❖ Domaine d'utilisation d'animaux expérimentaux

- Caractère licite (licéité) : L'étude envisagée doit avoir un caractère de nécessité et ne doit pas pouvoir être remplacée par une autre méthode expérimentale qui éviterait le recours à des animaux vivants. Elle doit être réalisée aux fins :
- Diagnostic, prévention ou traitement des maladies et d'autres anomalies de l'homme, des animaux ou des plantes ;
- Essai d'activité, d'efficacité et de toxicité des médicaments et des autres substances biologiques et chimiques et de leurs compositions, y compris les radioéléments et les matériels à usage thérapeutique pour l'homme et les animaux ;
- Contrôle et d'évaluation des paramètres physiologiques chez l'homme et les animaux;



- Contrôle de qualité des denrées alimentaires ;
- Recherche fondamentale / appliquée ;
- Enseignement supérieur ;
- Enseignement technique et de formation professionnelle (métiers qui comportent la réalisation d'expériences sur des animaux ou le traitement et l'entretien des animaux) ;
- Protection de l'environnement.

#### ❖ **La charte française de l'expérimentation animale (1979)**

- *Art 1 : Les progrès de la connaissance humaine, et notamment ceux de la biologie, de la médecine de l'homme et des animaux, sont nécessaires.*
- *Art 2: L'homme a besoin d'utiliser l'animal dans sa quête de la connaissance commune, pour se nourrir, se vêtir et travailler. Il a ainsi le devoir de respecter l'animal, cet auxiliaire, être vivant comme lui.*
- *Art 3: Toute personne pratiquant l'expérimentation biologique doit prendre conscience que l'animal est doué de sensibilité, de mémoire et qu'il est capable de souffrir sans pouvoir échapper à la douleur.*

#### ❖ **L'évaluation éthique (Comité)**

- Assurer qu'à chaque étape de la réalisation d'une étude ou d'un projet, l'animal est pris en compte en tant qu'être vivant sensible.
- Permettre de comprendre la nécessité scientifique du recours aux animaux vivants, ainsi que la raison du choix de l'espèce.
- Le comité doit pouvoir constater que les principes de la bientraitance sont respectés et que les conditions d'utilisation des animaux sont optimisées (principe des 3R) compte tenu des nécessités expérimentales.

NB : *L'avis du comité doit être donné avant que ne débute l'étude.*

#### ❖ **Devenir des animaux :**

Il peut arriver que l'état général d'un animal se dégrade rapidement et de façon imprévisible en cours d'étude :

- Exemple, dans des études de toxicologie ou de pharmacologie sur de nouvelles substances.

- Détecter un état général très dégradé chez un animal et pour agir rapidement dans le but d'éviter des douleurs inutiles tout en préservant autant que possible l'objectif de l'étude. Il existe une liste de critères qui permettent de reconnaître pour chaque espèce un état général très dégradé.
- **Réutilisation d'animaux:** permet l'économie de vies animales et l'utilisation d'animaux aux caractéristiques biologiques mieux connues; fréquente pour certains domaines comme la pharmacocinétique ou quand le recours à la télémétrie est pratiqué. Cependant, la réutilisation d'animaux doit respecter la réglementation, la santé des animaux et la nécessité de validité scientifique des études.
- Pour différentes raisons, l'**euthanasie** est souvent pratiquée. Outre le choix de la méthode d'euthanasie,
- Il ne peut être procédé sans anesthésie ou analgésie à plus d'une intervention douloureuse sur un même animal.
- **La remise en liberté d'animaux :** Elle est envisagée pour des animaux sauvages ou domestiques (avec autorisation).

## Biosécurité des laboratoires

Il existe **4 niveaux de risque biologique** et un groupe de risque associé à chacun de ces niveaux.

- Les niveaux de confinement définissent certaines exigences matérielles et les groupes de risque reflètent la pathogénicité des divers organismes.
- Le niveau de biosécurité 1 correspond au risque le moins élevé et le niveau de biosécurité 4 correspond au risque le plus élevé pour la santé humaine et animale.

❖ **Niveau 1** : Les agents infectieux du groupe de risque 1 sont des agents biologiques qui ont peu de chances de provoquer la maladie chez les travailleurs ou les animaux en bonne santé (risque faible pour l'individu et la collectivité).

**- Installations de confinement des organismes du groupe 1 - Niveau de confinement 1** : Aucun équipement particulier et aucune installation ou procédure particulière. Il suffit de disposer d'animaleries et de laboratoires ordinaires bien conçus ainsi que de pratiques générales de travail sans danger. Il doit y avoir des installations de lavage des mains et on doit employer les désinfectants de façon appropriée.

❖ **Niveau 2** : Les agents infectieux sont des pathogènes qui peuvent provoquer la maladie chez l'humain ou l'animal mais qui, dans des circonstances normales, ont peu de chances de représenter un danger grave pour les employés de laboratoire, la collectivité ou l'environnement (risque modéré pour l'individu, risque limité pour la collectivité). Ex: *E. coli*, de nombreuses salmonelles, certains champignons (teigne), virus de l'herpès simplex humain, de nombreux virus de la grippe et quelques parasites.

**Installations, équipement et procédures de confinement des organismes du groupe 2 - Niveau de confinement 2 :**

- Laboratoire isolé des autres activités, signe de mise en garde de risque biologique, surfaces intérieures imperméables et faciles à nettoyer.
- Équipement obligatoire : autoclave et enceinte de sécurité biologique équipée de filtres à air
- Équipement de protection individuelle obligatoire : gants que l'on met pour manipuler les animaux infectés.

- Tout le matériel contaminé doit être convenablement décontaminé.
- ❖ **Niveau 3** : Les agents infectieux sont des pathogènes qui causent généralement des maladies graves chez les humains ou les animaux ou qui peuvent entraîner des conséquences économiques sérieuses, mais qui ne se propagent habituellement pas par contact occasionnel entre deux individus (risque élevé pour l'individu, risque faible pour la collectivité) ou qui peuvent être traités à l'aide d'agents antimicrobiens ou antiparasitaires. Ex: bactéries (charbon, fièvre Q, tuberculose), virus (VIH), tous les isolats...
- **Installations, équipement et procédures de confinement des organismes du groupe 3** :
  - Accès contrôlé à double porte et douche personnelle.
  - Le système de ventilation: pression toujours inférieure à celle des zones adjacentes; air non recyclé mais évacué par filtre à air à haute capacité.
  - L'ameublement réduit au minimum, facile à nettoyer et à stériliser (fumigation); Vitres scellées incassables et d'un système électrique de secours.
  - **Équipement obligatoire** : autoclave et enceinte de sécurité biologique équipée de filtres à air certifiés à haute capacité pour la manipulation des organismes; pour le lavage des mains, évier séparé à commande à pied, à genou ou automatique et placé près de la sortie.
  - **Équipement de protection individuelle obligatoire** : vêtements protecteurs sans ouverture sur le devant qui ne sont portés que dans le laboratoire, bonnets et chaussures spéciales, gants qu'on porte pour manipuler les animaux infectés et appareils respiratoires de protection selon les agents infectieux visés.
- **Procédures de sortie** : douche, selon les agents infectieux visés et les manipulations effectuées.
  - Tous les déchets d'origine animale doivent être éliminés comme des substances de laboratoire contaminées.

- Toutes les opérations portant sur des matières contaminées doivent être effectuées dans des enceintes de sécurité biologique ou à l'aide des dispositifs appropriés de protection individuelle et de confinement physique.
- Le personnel de laboratoire doit avoir reçu une formation complète pour la manipulation dans de tels laboratoires
- ❖ **Niveau 4**: Les agents infectieux sont des pathogènes qui produisent généralement chez l'humain ou l'animal des maladies très graves souvent **impossibles à traiter** et qui se transmettent facilement d'un individu à un autre ou d'un animal à un humain ou vice-versa, directement ou indirectement ou par contact occasionnel (risque élevé pour l'individu, risque élevé pour la collectivité).
- Les agents infectieux du groupe de risque 4 sont **tous des virus** : *Ebola, virus simien B et fièvre aphteuse*.
- Le niveau de confinement 4 est le plus élevé, Les unités doivent être physiquement isolées des autres zones et indépendantes du point de vue fonctionnel.
- Installations sont hautement spécialisées et équipées d'un **sas** d'entrée et de sortie, d'enceintes de sécurité biologique de catégorie III ou de combinaisons pressurisées avec circulation d'air et d'un système de ventilation indépendant permettant de circonscrire la contamination.
- **Seuls les employés dûment autorisés et ayant reçu une formation complète** peuvent pénétrer dans le laboratoire de niveau de confinement 4. Lorsqu'ils en sortent, ils doivent se doucher et remettre leurs vêtements d'extérieur.
- Toutes les manipulations portant sur les agents visés doivent être effectuées dans les enceintes de sécurité biologique de classe III ou à l'aide de combinaisons pressurisées avec circulation d'air.

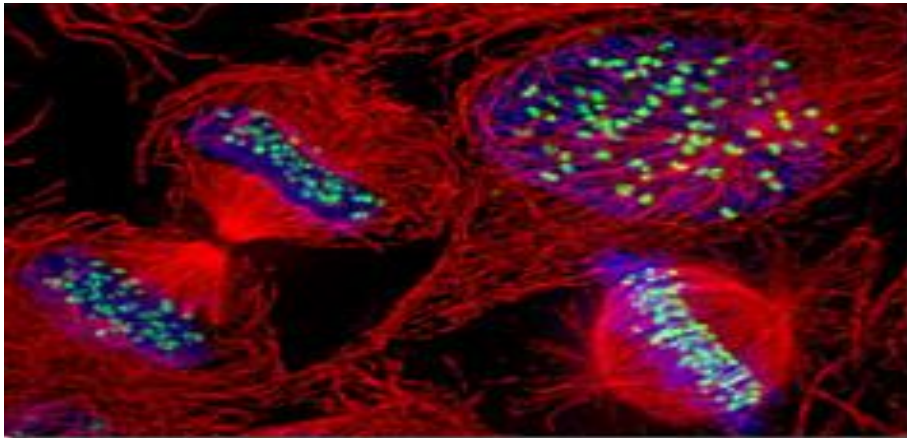
## Chapitre 4 : Systèmes modèles expérimentaux

### I. Modèles expérimentaux animaux (Voir partie TD)

### II. Modèles expérimentaux cellulaire

#### 1. Culture cellulaire ?

**Définition :** Ensemble de techniques de biologie utilisées pour faire croître des cellules hors de leur organisme (*ex-vivo*) ou de leur milieu d'origine, dans un but d'expérimentation scientifique ou de fécondation in vitro.



*Cellule humaine en mitose*

#### 2. Types de culture :

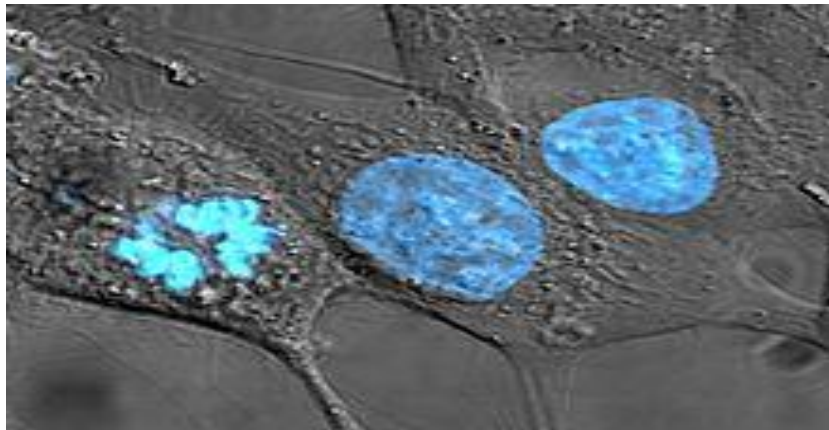
- ✓ Culture cellulaire: maintien en dehors de l'organisme, des cellules *non organisées en tissu* mais capable de se diviser *in vitro* et d'exprimer des métabolismes et des fonctions spécifiques.
- ✓ Culture tissulaire: maintien en dehors de l'organisme, des tissus de manière à conserver les fonctions spécifiques de chaque tissu.
- ✓ Culture d'organe: maintien en dehors de l'organisme, d'organes ayant conservé leur structure et leur fonction.

#### 3. Historique de la culture cellulaire :

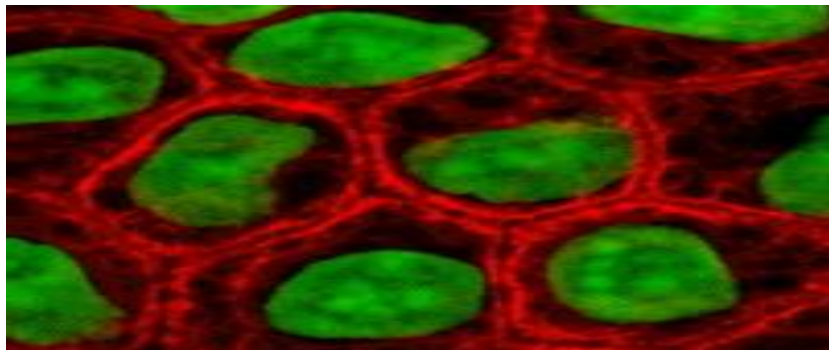
- **1885, 1900: Pr Ross Harrison** a pu cultiver des neuroblastes de grenouille dans un milieu de lymphe.
- En **1912, Alexis Carrel** (chirurgien français), réussit à mettre en culture les cellules d'un cœur de poulet.
- La véritable avancée se produisit en **1951** lorsque les cellules *d'Henrietta Lacks*, (cellules HeLa) prélevées lors de son opération du cancer et cultivées par le

biologiste **George Gay**, se révélèrent « immortelles » en se reproduisant à l'infini (toujours utilisées en laboratoire de nos jours).

- En **1952, Moscona** procède à la digestion de tissu d'œuf de poulet avec de la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser *in vitro*.



*Cellules HeLa colorées de manière à montrer leur noyau cellulaire en fluorescence bleue sous un éclairage particulier.*



*Cellules épithéliales en culture, colorées de manière à faire apparaître la kératine (en rouge) et l'ADN (en vert)*

#### 4. Origine des cellules :

- **Micro-organismes libres** (bactéries ou levures)
- **Culture primaire:** Cellules saines prélevées fraîchement d'un organisme (biopsie); ne peuvent habituellement pas être maintenues en culture indéfiniment, notamment à cause de leur nombre limité de divisions (limite de Hayflick).

- **Lignées cellulaires:** Cellules ayant une capacité de division non limitée « *immortalité en culture* »: cellules cancéreuses, cellules en voie de cancérisation, cellules saines rendues « immortelles » artificiellement ou des cellules souches.
  - **Des tranches d'organes** (d'épaisseur optimisée selon le tissu)

## 5. Culture des micro-organismes :

- Les micro-organismes sont cultivés en suspension dans un milieu de culture ou sur un support nutritif semi-solide dans des boîtes de Petri.
- Les conditions physico-chimiques de croissance des bactéries en culture varient beaucoup, aussi bien en termes de température, pression atmosphérique, salinité du milieu, composition en biomolécules, et même parfois luminosité (ex certaines cyanobactéries).

## 6. Les techniques d'obtention des cellules : On distingue 2 types de cellules:

- Les **cellules libres et circulantes:** comme les cellules du sang: obtenues par *prélèvement et centrifugation*.
- Les **cellules organisées en tissus:** nécessitent la mise en œuvre de techniques plus originales qui peuvent être divisées en 2 groupes: la *méthode par dissection* et la méthode par *digestion enzymatique*.

## 7. Étapes générales de la culture cellulaire :

- Décongeler une ampoule de cellules conservée en milieu de culture adapté + un agent protecteur (qui permet d'éviter une trop grande mortalité lors de la congélation en évitant la formation de gros cristaux dans la cellule et donc une lyse).
- Eliminer l'agent protecteur (ex DMSO, toxique pour les cellules) par centrifugation en éliminant le surnageant,
- Rajouter du milieu de culture adapté frais.
- Mettre la suspension dans un flacon de culture (flacon plat, boîte de Petri) que l'on met à l'incubateur.

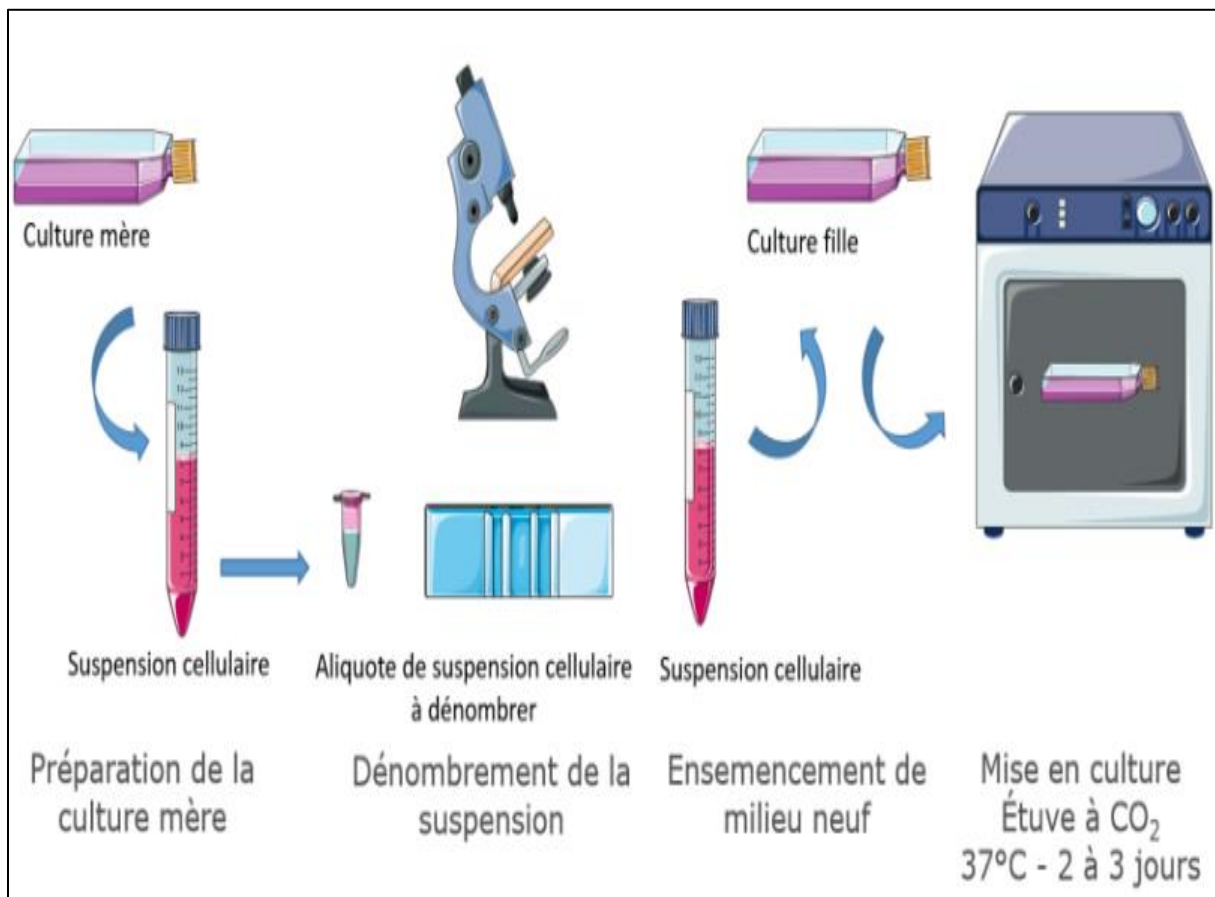
## 8. Conditions d'une culture des cellules animales :

- Les cellules animales sont cultivées en incubateurs, à une température de 37 °C et dans une atmosphère très humide à teneur en CO<sub>2</sub> contrôlée (souvent 5 %).
- Certaines cellules sont cultivées en suspension dans leur milieu nutritif (cellules non-adhérentes), d'autres sur des plastiques traités leur offrant des capacités



d'adhérence. Ces supports peuvent prendre la forme de boîtes de différents formats ou de *flasks*.

- On peut cultiver également les cellules dans des environnements tridimensionnels reconstitués proche des matrices extracellulaires naturelles (Matrigel).

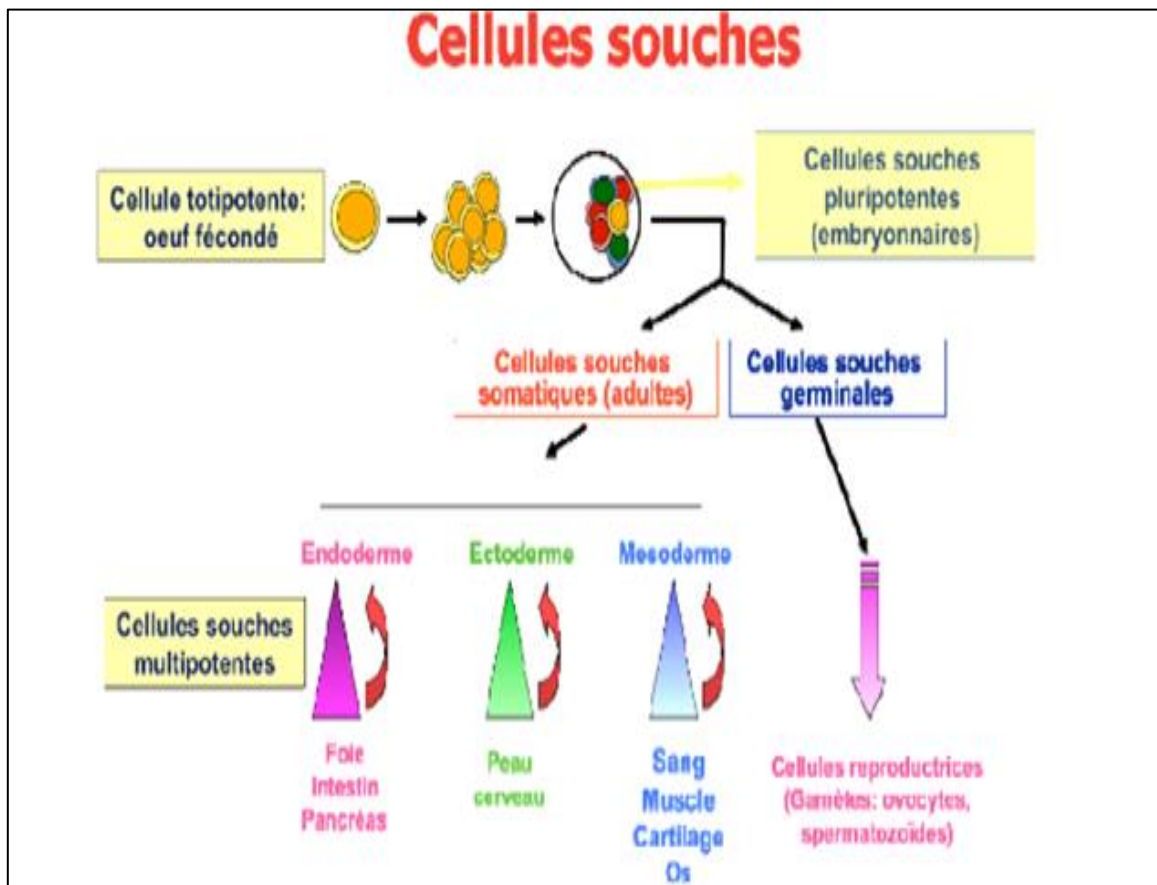


### Etapes d'une culture cellulaire

#### 9. Techniques particulières de culture cellulaire :

- Optimisation des conditions « atmosphériques » (ajout d'oxygène, etc.)
- Optimisation de la composition des milieux nutritifs (ajout de certaines hormones, etc.)
- Optimisation des supports (composition en biomolécules, etc.)
- Culture sous agitation ou co-culture (+cellules « nourricières »)
- Culture sur des tissus préalablement « tués » par un procédé de congélation/décongélation.... Etc.

## 10. Evolution des cellules en culture :

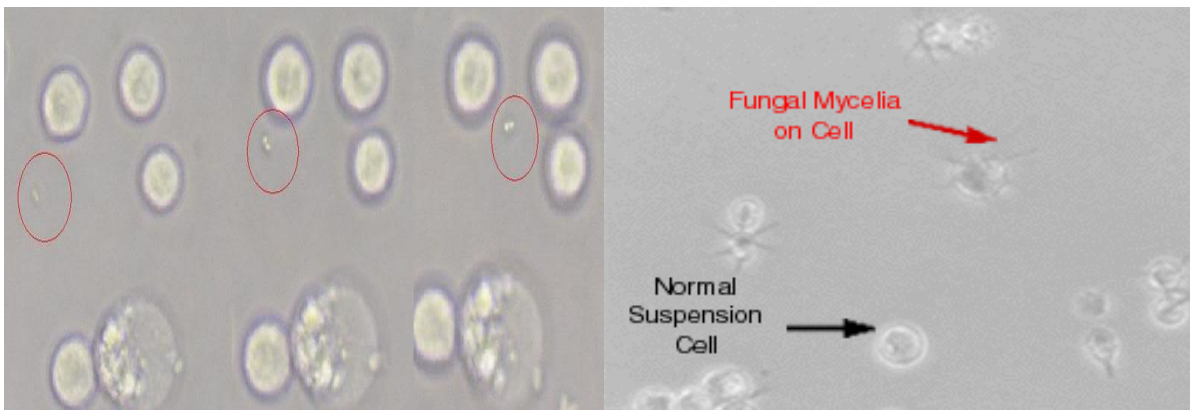
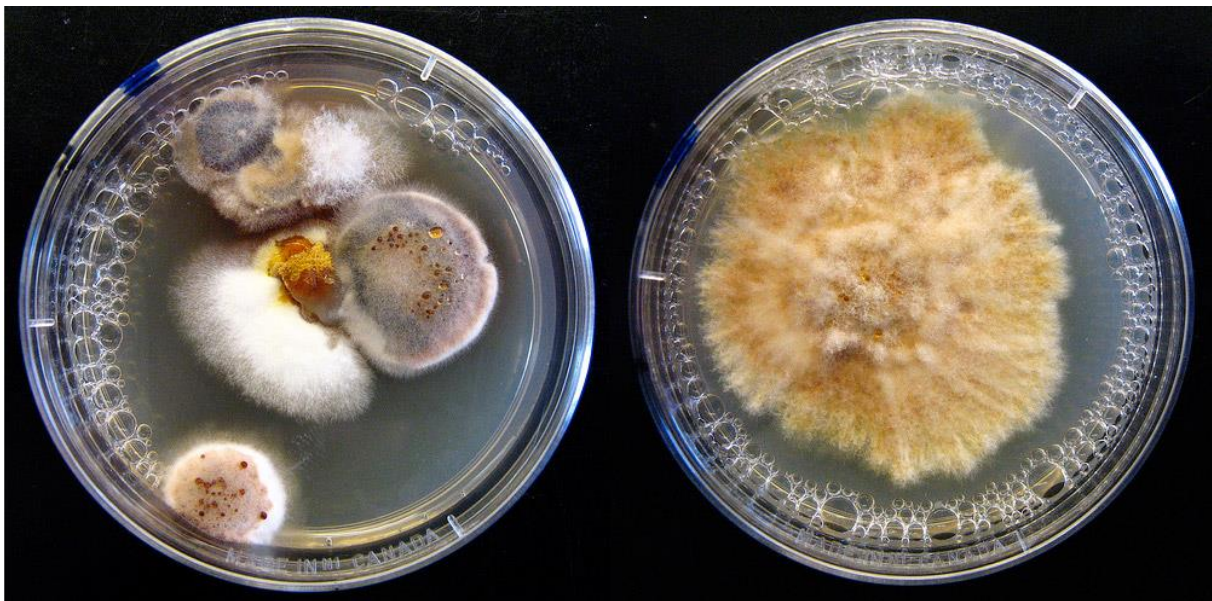


### Types des cellules souches

- Les cellules in-vitro présentent 2 propriétés fondamentales:
  - la capacité proliférative
  - leur fonction différenciée.
- Les cellules conservent la plupart du temps leur potentiel de division, pouvant être stimulé au début de la culture par des facteurs de croissances (on peut noter un ralentissement).
- Les cellules en culture voient souvent leur fonction différenciée se modifier et même disparaître (cette différenciation peut être visible morphologiquement).
- Certains types cellulaires ne révèlent leur fonction spécifique que lorsqu'ils sont cultivés en vie ralentie (après un appauvrissement progressif du milieu ou une substance inhibitrice de la division cellulaire).

## 11. Contaminations de Cellules, tissus, liquides:

- Les lignées cellulaires d'origine animale peuvent être contaminées par des mycoplasmes ou des virus propres aux rongeurs.
- En 1998, l'origine d'une éclosion infectieuse était un sérum de souris contaminé. Avant d'employer ces substances sur des animaux, on doit les tester pour détecter toute infection.
- Les lignées cellulaires d'origine humaine qui ont subi des passages ou qui ont été maintenues dans des animaux peuvent également être contaminées.



**Contamination de culture cellulaire**

## **Secteurs d'application : À quoi servent les cultures de cellules?**

### **1. Systèmes de modèles:**

Les cultures cellulaires fournissent de bons systèmes de modèles pour étudier:

- la biologie et la biochimie cellulaires de base,
- les interactions entre les cellules et les agents induisant des maladies,
- les effets des médicaments sur les cellules,
- le processus et le déclenchement du vieillissement
- les études nutritionnelles.

### **2. Tests de toxicité:**

Les cellules en culture sont largement utilisées seules ou en conjonction avec des tests sur les animaux pour étudier les effets de nouveaux médicaments, cosmétiques et produits chimiques sur la survie et la croissance d'une grande variété de types de cellules.

Les cultures de cellules dérivées du foie et des reins sont particulièrement importantes.

### **3. Recherche sur le cancer:**

- Les cellules normales et les cellules cancéreuses pouvant toutes deux être cultivées, les différences de base entre elles peuvent être étudiées de près.
- il est possible, en utilisant des produits chimiques, virus et rayonnements, de convertir les cellules cultivées normales en cellules cancéreuses: étudier les mécanismes conduisant à ce changement.
- Les cellules cancéreuses cultivées servent également de système de test pour déterminer les médicaments et méthodes adaptées pour détruire sélectivement certains types de cancers.

### **4. Virologie:**

Une des utilisations les plus précoces et les plus importantes des cultures cellulaires a été la réplication de virus dans les cultures cellulaires (à la place des animaux) pour les utiliser dans la production de vaccins.

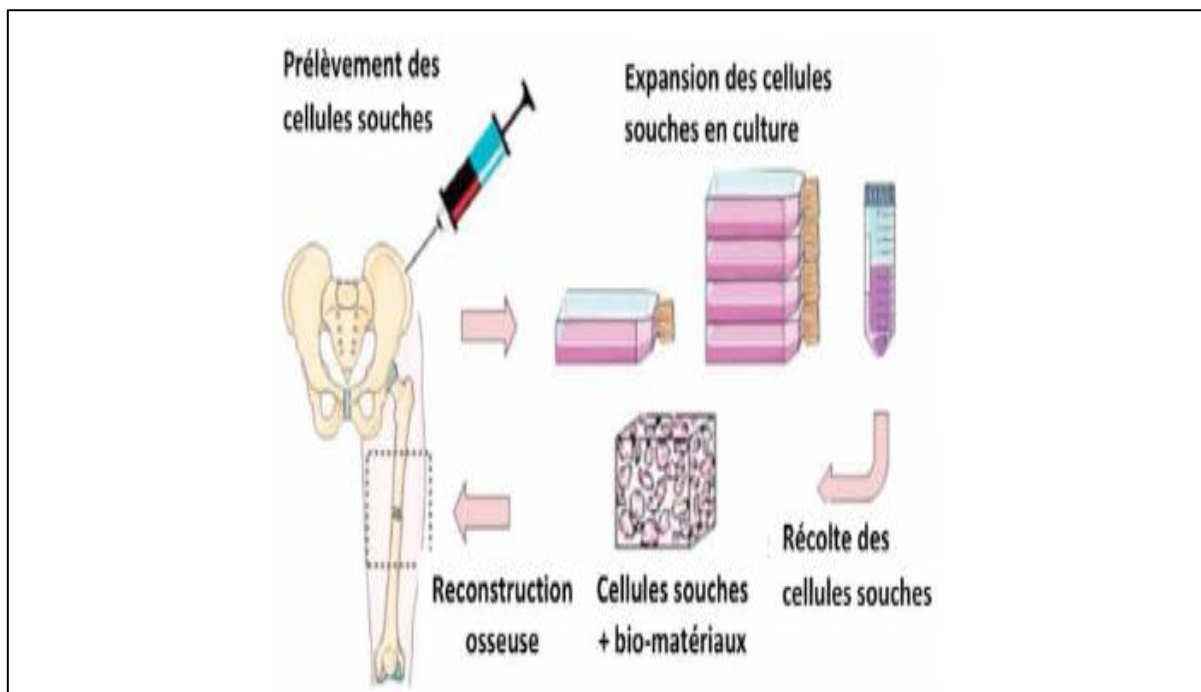
Les cultures cellulaires sont également largement utilisées en détection clinique et isolement de virus, en recherche fondamentale pour étudier comment se développent et infectent les organismes.

## 5. La cellule comme usine de production de produits :

- ✓ Production à grande échelle de virus pour une utilisation en production de **vaccins**: comprend les vaccins contre la polio, la rage, la varicelle, l'hépatite B et la rougeole.
- ✓ Production à grande échelle de cellules génétiquement modifiées pour produire des **protéines** présentant une valeur médicale ou commerciale (inclut les anticorps monoclonaux, l'insuline, les hormones, etc).

## 6. Utilisation de cellules en remplacement de tissus et d'organes:

La peau artificielle utilisée pour le traitement de brûlures et d'ulcères est le premier produit disponible dans le commerce.



## Cellule souches et thérapie

## 7. Tests en cours sur des organes artificiels:

Le pancréas, foie et reins: réserve potentielle de cellules/tissus de remplacement avec des cellules souches adultes et embryonnaires (qui ont le potentiel de se différencier en plusieurs types cellulaires différents). Apprendre à contrôler le développement de ces cellules représente un espoir pour de nouvelles approches de traitements pour une large variété de pathologies.

**8. Conseil génétique:** L'amniocentèse: une technique diagnostique qui permet aux médecins de prélever des cellules fœtales sur des femmes enceintes et de les cultiver, a mis à la disposition des médecins un outil important pour le diagnostic précoce d'affections fœtales. Ces cellules peuvent être examinées pour rechercher des anomalies dans leurs chromosomes et gènes à l'aide de caryotypes, chromosome painting et autres techniques moléculaires.

**9. Génie génétique:**

- La capacité de transférer ou de reprogrammer les cellules en culture par du nouveau matériel génétique (ADN et gènes) a fourni un outil précieux aux biologistes moléculaires désireux d'étudier les effets cellulaires de l'expression de ces gènes (nouvelles protéines). Ces techniques peuvent également être utilisées pour produire ces nouvelles protéines en grande quantité dans les cellules en culture pour les étudier.
- Les cellules d'insectes sont largement utilisées comme usines cellulaires miniatures pour exprimer des quantités substantielles de protéines qu'elles fabriquent après avoir été infectées par des baculovirus génétiquement modifiés.

**10. Thérapie génique:** La capacité de modifier génétiquement des cellules a également conduit à leur utilisation en thérapie génique. Les cellules peuvent être prélevées sur un patient souffrant d'une déficience dans un gène fonctionnel, et le gène manquant ou endommagé peut alors être remplacé. Les cellules sont cultivées un moment puis réimplantées dans le patient. Une approche alternative consiste à placer le gène manquant dans un vecteur viral puis "d'infecter" le patient par le virus en espérant que le gène manquant sera exprimé dans les cellules du patient.

**11. Découverte de médicaments :** L'importance des tests basés sur des cellules a considérablement augmenté dans l'industrie pharmaceutique, pas seulement pour les tests de cytotoxicité, mais également pour le criblage à haut débit (HTS) de composés pouvant présenter une utilité potentielle comme médicament. À l'origine, ces tests de culture cellulaire étaient réalisés dans des plaques de 96 puits, mais les plaques de 384 et 1536 puits sont maintenant de plus en plus utilisés.

## **Chapitre 5 : Perspectives de modélisation du vivant**

### **Développement de stratégies de modélisation**

La biologie à grande échelle est à l'origine d'une masse considérable de données qui concerne tous les niveaux du vivant :

- les gènes, les protéines et leurs interactions,
- les génomes, leur dynamique et leur évolution,
- les cellules, leur organisation et les mécanismes moléculaires sous-jacents,
- les organes et leur fonctionnement,
- les organismes et leur physiologie,
- les espèces et populations,
- les systèmes écologiques.

#### **1. Biomathématique :**

Les biomathématiques sont constituées par l'ensemble des méthodes et techniques mathématiques, numériques et informatiques qui permettent d'étudier et de modéliser les phénomènes et processus biologiques. Science fortement pluridisciplinaire que le mathématicien seul (ou le biologiste seul) est incapable de développer.

Les biomathématiques ont des débouchés tant pratiques que théoriques dans de nombreux domaines comme la biologie des populations, la physiologie, la génomique, la pharmacologie etc.

#### **2. Modélisation en physiologie :**

##### **❑ *Modélisation cellulaire:***

- Modélisation des neurones et des agents cancérigènes.
- Mécanique des tissus biologiques.
- Enzymologie et cinétique enzymatique.
- Modélisation et simulation du cancer.
- Modélisation de l'interaction entre des populations de cellules en mouvement.
- Modélisation mathématique de la formation de cicatrices dans les tissus.

##### **❑ *Modélisation de systèmes physiologiques:*** Modélisation des maladies cardiovasculaires.

### ❑ **Cellules reprogrammées dans la modélisation des maladies :**

- La recherche est nécessaire pour comprendre et combattre les maladies. Mais la recherche se trouve souvent limitée par l'accès aux patients et la disponibilité de tissus malades à étudier.
- Des '**modèles pathologiques**' peuvent aider à surmonter ces problèmes en permettant aux scientifiques d'étudier les maladies en laboratoire. Les cellules souches, y compris les cellules reprogrammées ou cellules 'iPS', sont une nouvelle source de cellules qui peuvent servir de modèles pour des maladies qui, sans quoi, sont difficiles à étudier.

### **3. Modélisation pathologique et domaines d'application :**

Les maladies humaines sont nombreuses et variées ; certaines sont mortelles, d'autres ne sont qu'un désagrément mineur. La possibilité ou non de traiter une maladie dépendra souvent de notre bonne connaissance de sa biologie fondamentale. Sans recherche pour découvrir les mécanismes d'une maladie, il est difficile de faire progresser les traitements.

La **modélisation pathologique** permet aux scientifiques d'étudier les mécanismes des maladies en laboratoire, plutôt que directement chez le patient.

Un modèle de maladie est la représentation des anomalies biologiques humaines ou animales qui se produisent dans une maladie spécifique. Le modèle peut être une souris dont l'état reproduit une pathologie humaine, ou ce pourrait être des cellules en culture. Quelque soit le modèle, il doit reproduire hors du corps humain des caractéristiques d'une maladie, voire même la pathologie d'une maladie dans sa totalité (toutes les conséquences physiques de la maladie).

### ❑ **Cellules étudiées en modélisation pathologique :**

- La recherche sur les cellules cancéreuses a grandement contribué à ces avancées car ces cellules ont la capacité de proliférer longtemps voire indéfiniment en présence des nutriments adéquats.
- Les cellules saines ont une durée de vie limitée et sont beaucoup plus difficiles à maintenir et multiplier en culture. Elles peuvent aussi être difficiles à obtenir.
- Certaines cellules, comme les cellules de la peau ou les cellules sanguines peuvent être assez facilement prélevées chez un patient, d'autres sont beaucoup plus difficiles voire impossibles à obtenir pour la recherche.



- Les cellules du cerveau humain, sont difficiles à prélever sans une intervention chirurgicale lourde, or on en a besoin pour étudier un grand nombre de maladies neurodégénératives.

- Certains types de cellules souches pourraient offrir une solution.

#### ❑ **Cellules souches :**

- Les *cellules souches* peuvent s'auto-renouveler ou se différencier en cellules plus spécialisées.
- **Cellules embryonnaires:** isolées à partir d'embryons à un stade précoce, ont aussi la capacité de produire l'ensemble des différentes cellules de l'organisme.
- Un type particulier de cellule souche constitue un outil puissant pour la modélisation de maladies : les cellules *souches pluripotentes induites* ou cellules iPS. Source de cellules qui sont autrement difficiles à obtenir, comme les cellules du cerveau.

#### ❑ **Cellules iPS ?**

- Les cellules ***souches pluripotentes induites*** (CSPi) (en anglais *Induced pluripotent stem cells* soit iPS ou iPSCs) sont des cellules souches pluripotentes qui ont été fabriquées en laboratoire, à partir de cellules adultes, sont obtenues en 'reprogrammant' des cellules spécialisées comme les cellules de la peau. Les cellules iPS qui en résultent peuvent produire l'ensemble des différentes cellules de l'organisme.
- Elles sont considérées comme l'une des avancées majeures de la biotechnologie récente puisqu'elles pourraient potentiellement permettre de contourner les problèmes éthiques liés aux cellules souches embryonnaires humaines

#### ❑ **Cellules souches iPS: Avantages**

- Les scientifiques recherchent des méthodes pour différencier à la demande des cellules iPS en un type spécifique de cellule.
- Les cellules iPS présentent un avantage unique pour la modélisation des maladies : elles peuvent être obtenues en reprogrammant les propres cellules de la peau d'un patient pour générer en laboratoire des cellules spécifiques au patient. Si la maladie a une cause génétique, les cellules cultivées en laboratoire porteront cette anomalie génétique.
- La reprogrammation agit comme une machine à remonter le temps, prenant des cellules matures comme les cellules de la peau et leur restituant leurs caractères embryonnaires antérieurs.

- Ces cellules iPS à caractère embryonnaire sont utilisées pour générer toute cellule que le chercheur veut étudier, des stades précoces aux stades tardifs du développement cellulaire.

#### ❑ Exemple de Modélisation pathologique iPS: Maladie d'Alzheimer (Mason et al. 2012)

- Prélèvement des cellules iPS à l'aide d'échantillons de peau prélevés chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ainsi que chez des personnes non atteintes.
- Génération en laboratoire sur une période d'environ 8 semaines, des cellules nerveuses à partir de ces cellules iPS.
- Après avoir purifié ces cellules nerveuses, comparaison de celles issues de patients atteints d'Alzheimer aux échantillons de non atteints.
- *Une question clé:* aurait-il une différence notable entre les deux groupes de cellules. La maladie est liée à l'âge et atteint l'organisme après de nombreuses années, tandis que les cellules nerveuses en laboratoire n'ont que 8 semaines:

La maladie pouvait-elle être reproduite dans ces cellules jeunes ?

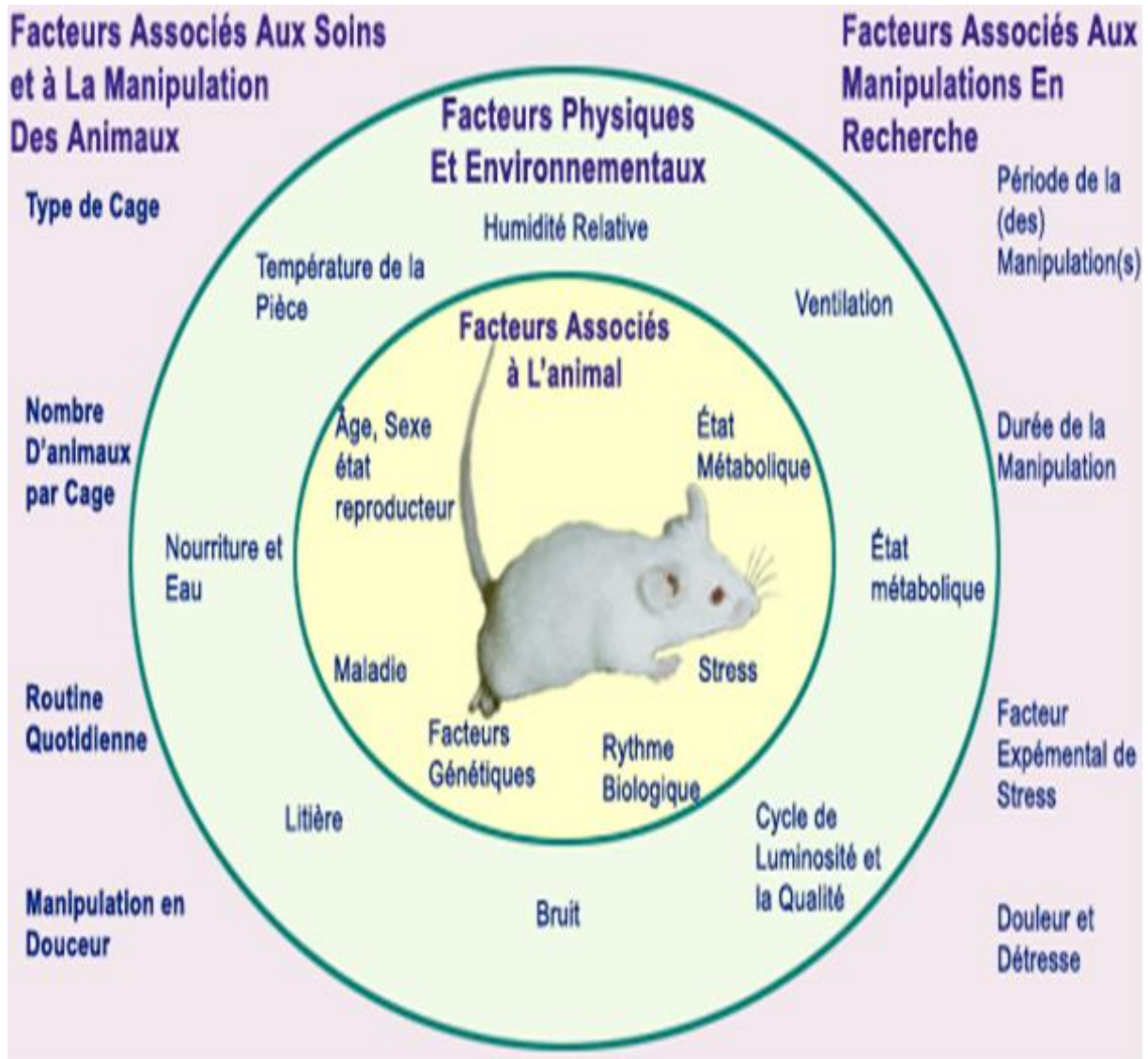
- L'étude a pu en déceler des différences entre les cellules issues des patients et les cellules normales et a pu attribuer à la maladie les caractéristiques des cellules issues des patients. La maladie d'Alzheimer (certaines de ses caractéristiques) *peut* donc être modélisée en laboratoire à l'aide de cellules iPS – Alzheimer (TRT).

#### ❑ L'élaboration de futurs traitements :

- Les cellules iPS donnent aux chercheurs la possibilité d'étudier des cellules humaines auparavant inaccessibles, comme les cellules nerveuses du cerveau. Leur utilisation dans des modèles de maladies procure un nouveau tremplin vers une meilleure compréhension des mécanismes de nombreuses maladies.
- De nombreux travaux de recherche avec les cellules iPS sont déjà en cours et les chercheurs espèrent que les modèles pathologiques iPS fourniront des pistes très utiles pour la mise au point de nouveaux médicaments ou d'autres traitements cliniques.

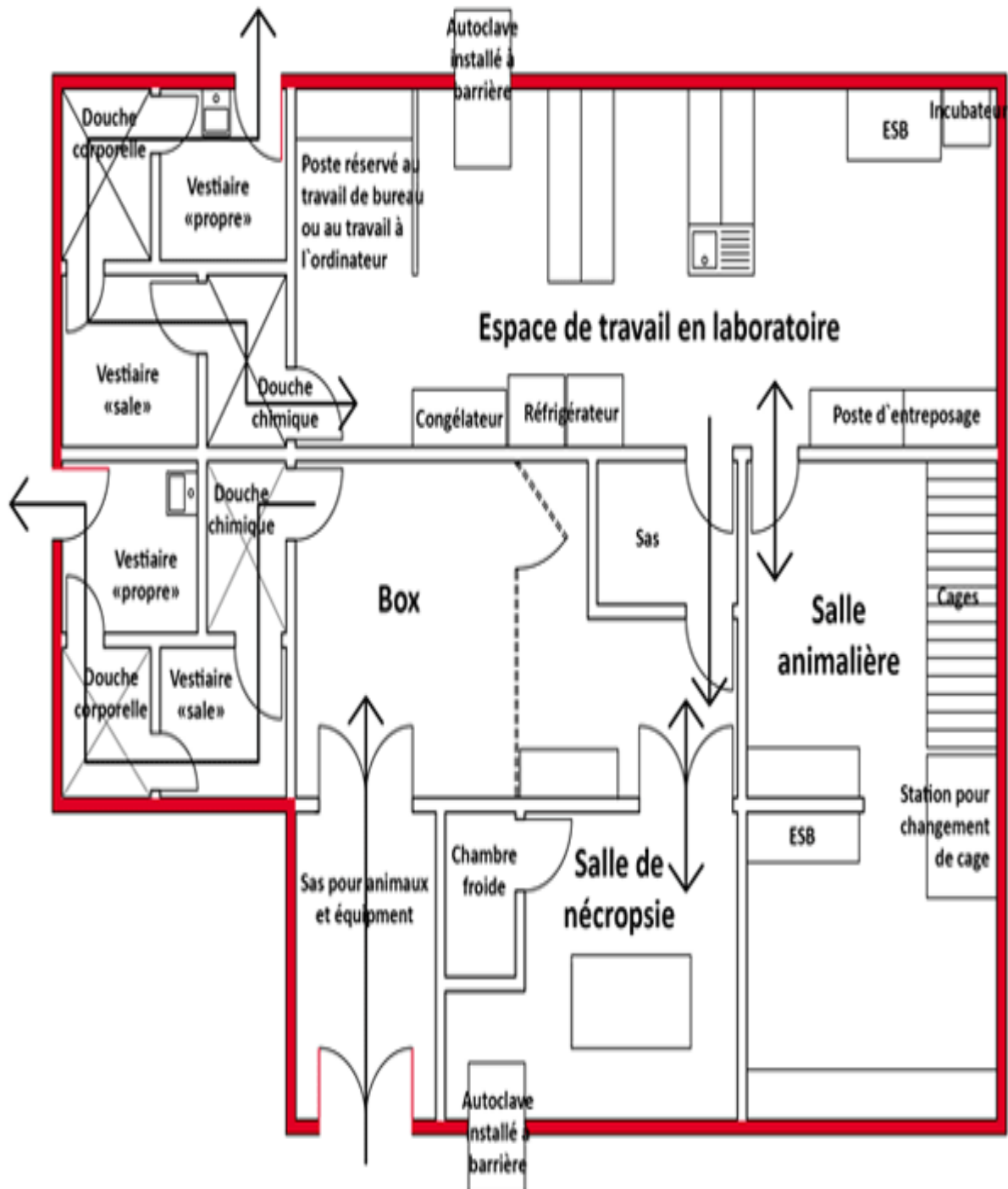
## Partie 2/Travaux Dirigés

« *Qualité des soins aux animaux = Qualité de la recherche scientifique* »



*Variables expérimentales et non expérimentales*

## TD n° 1: Règles de base dans une Animalerie



Structure d'une animalerie

## 1. Facteurs physiques et environnementaux :

Ils diffèrent d'une espèce à une autre. L'exemple du rat sera ici évoqué.

❖ **Température Ambiante :** Les petits animaux de laboratoire réagissent aux variations de température en modifiant leur comportement (ex : frisson, contact physique entre individus) et la vitesse de leur métabolisme (consommation d'une plus grande quantité de nourriture s'ils doivent accroître leur production de chaleur corporelle). Ces modifications peuvent se répercuter sur plusieurs processus métaboliques, y compris le métabolisme des médicaments. Par conséquent on doit limiter les fluctuations journalières de température ambiante à +/- 2 °C (à l'aide d'un bon système de chauffage et de ventilation). On doit aussi assurer le suivi et l'enregistrement des fluctuations journalières de température. Pour certains types d'études, il peut être nécessaire de mesurer les paramètres à l'intérieur des cages (microclimat) et non de la pièce où elles se trouvent.

❖ **Humidité Relative :** Dans la pièce où sont logés les animaux, l'humidité relative doit être maintenue à 55 % +/- 15 %. Cet aspect revêt une certaine importance pour plusieurs raisons : le bien-être et le confort des animaux (et du personnel), la réduction de la viabilité des micro-organismes aériens et donc de la propagation des maladies, et la réduction des quantités d'allergènes. Si l'humidité relative (HR) est inférieure à 40 % pendant une longue période, il peut apparaître une irritation des voies respiratoires et des cas de nécrose annulaire de la queue chez les jeunes rats non sevrés.

❖ **Ventilation :** Dans l'animalerie, le taux recommandé de renouvellement de l'air est de 15 à 20 fois par heure. Ces taux sont élevés si on les compare à ceux des bureaux ou des laboratoires, mais ils sont nécessaires pour évacuer la chaleur, l'ammoniac, les particules aériennes (poussières et allergènes) et le dioxyde de carbone produits par les animaux. Les cages à micro isolation statiques peuvent contenir des concentrations élevées d'ammoniac et de dioxyde de carbone même si la ventilation est bonne dans la salle même. Les pressions d'air différentielles entre les salles d'hébergement et les couloirs ou entre les différentes aires d'une animalerie constituent également un aspect important de la lutte contre la propagation des micro-organismes. Dans une animalerie

de laboratoire, la ventilation, la concentration d'ammoniac et de CO<sub>2</sub> et la circulation d'air peuvent accuser des écarts significatifs d'un endroit à l'autre.



❖ **Éclairage** : Chez les animaux, l'éclairage revêt plusieurs aspects : cycle jour-nuit, intensité de la lumière et longueur d'onde. Le cycle jour-nuit doit être commandé par une minuterie de sorte que l'état métabolique des animaux suive un rythme diurne constant. L'intensité et la longueur d'onde de la lumière ont également une certaine importance. Les rongeurs albinos en particulier subissent des lésions de la rétine lorsque l'intensité de l'éclairage dans la cage dépasse 300 lux. Le matin, l'allumage soudain de l'éclairage se répercute sur la concentration de certaines hormones, et ces effets peuvent se prolonger plusieurs heures. On suggère l'emploi de systèmes reproduisant l'aube et le crépuscule, c'est-à-dire créant une variation graduelle de l'intensité lumineuse entre les phases d'éclairage et d'extinction. Dans les études où l'intensité de l'éclairage risque d'influencer les résultats, on peut tenter d'éviter les biais de cette nature en attribuant aux animaux des différents groupes de traitement une place aléatoire sur le même support à cages.

❖ **Bruit** : Les effets du bruit sur le comportement et les réponses des animaux de laboratoire en recherche biomédicale ont été trop peu étudiés. Il est bien connu que les bruits forts peuvent déclencher des crises convulsives chez les jeunes rongeurs (on s'est fondé sur ce phénomène pour créer un modèle de crises audiogènes). L'intensité et la fréquence du son ont leur importance. Les rongeurs et certaines autres espèces d'animaux sont très sensibles aux ultrasons dont nous pouvons ignorer l'existence parce que notre oreille ne les perçoit pas. Les basses fréquences et les autres bruits, par exemple en provenance d'un chantier de construction voisin, peuvent également déranger les animaux.

❖ **Aliments et Eau :** Dans la plupart des animaleries, les procédures normalisées de fonctionnement (PNF) contiennent des dispositions relatives aux aliments (parfois certifiés) qui sont normalement distribués aux animaux à moins que le chercheur ait émis d'autres directives à cet effet. L'eau provient du réseau d'approvisionnement municipal et est parfois traitée dans l'installation même. Si l'étude rend nécessaires des dispositions particulières concernant l'alimentation ou l'eau, le chercheur doit en informer le directeur et les techniciens de l'animalerie. Les rats expérimentaux, par exemple, sont nourris avec des aliments secs en cubes d'origine commerciale. Les rats adultes mangent de 12 à 30 grammes d'aliments secs en cube quotidiennement et si le régime est complet, ils n'ont pas besoins de suppléments alimentaires. Les rats boivent 140 millilitres d'eau par kilogramme de poids corporel par jour. Ils boivent en moyenne 2 ml d'eau pour chaque gramme de nourriture sèches qu'ils mangent.



❖ **Litière des Animaux de Laboratoire :** Dans la plupart des animaleries, les procédés normalisés de fonctionnement (PNF) contiennent des dispositions relatives à la litière qui est normalement fournie aux animaux à moins que le chercheur ait émis d'autres directives à cet effet. Le chercheur principal doit préciser s'il y a des exigences particulières concernant la litière.

❖ **Cages :** L'espace dont dispose chaque animal et le nombre d'individus par cage peuvent avoir une influence sur la réponse à une expérience. Tous les animaux utilisés pour une étude donnée doivent être placés dans des cages identiques, de sorte que l'espace dont chacun d'eux dispose et le nombre d'individus par cage demeurent constants au cours de l'étude. Des études ont montré que le nombre de rongeurs par cage avait un effet sur leur niveau de stress (isolement ou surpopulation) et leur croissance. De façon générale on doit loger les petits rongeurs en groupes de quelques individus pour réduire leur stress et créer un enrichissement social. Si les animaux



doivent être logés dans des cages individuelles aux fins de la recherche, cet aspect doit être justifié par des arguments scientifiques auprès du comité de protection des animaux.



### **Cage et litière**

❖ **Soins de Routine (quotidiens, hebdomadaires) et Entretien** : Les opérations quotidiennes de routine effectuées par les préposés aux soins des animaux peuvent exercer une forte influence sur la réponse des animaux à une expérience. De façon générale, on doit tous les manipuler de façon uniforme, en douceur et à la même heure du jour. La plupart des animaux s'habituent vite aux personnes qui s'en occupent régulièrement, et ils ressentent plus de stress lorsque des inconnus font ce travail.

Le mode de manipulation d'un animal peut modifier son comportement ou sa physiologie et, par conséquent, influencer sa réponse dans une étude.

#### ❖ **Entretien et décontamination des locaux et des équipements**

- **L'hygiène des locaux** doit être rigoureuse. Les surfaces (sols, murs, plafonds, paillasses) doivent être nettoyées au moins une fois par semaine et ce, par voie humide pour les maintenir exempts de poussière.
- Le système de **ventilation** et les filtres doivent être maintenus en bon état de fonctionnement.
- L'utilisation de nettoyeurs à eau sous pression type Karcher qui génèrent des aérosols est à proscrire.



- Les **produits désinfectants** doivent être à large spectre, non corrosifs et avoir un effet rapide et constant ; l'emploi alterné de produits différents et complémentaires peut être très utile.
- La désinfection terminale des locaux vides d'animaux par **les vapeurs de formol**, est une solution efficace mais non dénuée de dangers. Elle nécessite la maîtrise des conditions de vaporisation du produit jusqu'à sa neutralisation.
- Les cages des animaux, selon la nature du risque et du but recherché, sont décontaminées par trempage à l'eau de javel diluée au 1/7 et préparée depuis 3 jours maximum (temps de contact 12 heures), nettoyées et si nécessaire stérilisées par autoclavage. efficace à condition de respecter les différentes étapes de température et de temps.

#### ❖ **Stockage et élimination des déchets**

- Tout producteur de déchets en est responsable jusqu'à leur totale élimination.
- Les **litières souillées** sont assimilées à des déchets sans risque. Elles doivent être stockées dans des conteneurs (cartons doublés plastique...), pour être éliminées avec les déchets DIB (déchets industriels banals).
- Le matériel jetable non contaminé par un produit infectieux, chimique et/ ou radioactif doit être éliminé selon la même filière, **à l'exception du matériel coupant et piquant**, conditionné dans des boites plastique, qui doit être éliminé avec les déchets contaminés DAS (Déchets d'activité de soins).
- les litières contaminées par un agent infectieux pour l'Homme ou par un OGM de classe 2 ou 3 doivent être inactivées puis éliminées selon la filière des déchets infectieux (DAS) Elles sont conditionnées dans des fûts plastiques à double fermeture.
- Les litières **contaminées par tout autre produit** doivent suivre les modalités de conditionnement, d'entreposage et d'élimination selon la filière adaptée. Le bordereau de suivi de déchets atteste de la bonne élimination des déchets produits. Les conteneurs, cartons ou fûts, doivent être fermés et identifiés.
- Les litières des animaleries transgéniques de classe A1 doivent être autoclavées avant leur élimination avec les DIB.
- Les **cadavres d'animaux**, sains ou contaminés par un agent infectieux ou par un OGM doivent être congelés, stockés pour être éliminés avec les DAS. Les cadavres d'animaux contaminés par un produit radioactif, stockés congelés séparément des autres, doivent être éliminés selon une procédure précise.

## TD n° 2 : Douleurs au cours de l'expérimentation

**Les réponses émotionnelles et leurs conséquences sur le fonctionnement de l'organisme :** La sensibilité et les émotions des animaux sont au cœur du débat sur l'expérimentation animale.

❖ **L'émotion :** un état affectif qui dépend de la représentation que l'individu se fait de son milieu. Elle se caractérise par :

- une composante subjective : n'est pas appréciable directement chez les animaux car ils ne peuvent communiquer leurs émotions.
- L'état émotionnel d'un animal peut être apprécié au travers des deux autres composantes : les modifications comportementales et neuroendocriniennes.

Exp : émotions négatives, qu'il s'agisse de peur (état émotionnel induit par la perception d'un stimulus menaçant) ou de souffrance liée à une douleur physique.



❖ **La douleur :** expérience sensorielle ou émotionnelle associée à un dommage tissulaire réel ou potentiel (selon la définition de l'International Society for the Study of Pain).

La douleur est une préoccupation constante pour tout neurophysiologiste. Deux types de douleur sont distingués :

- Douleur aiguë : signal d'alarme d'une lésion corporelle ;
- Douleur chronique : faisant intervenir le vécu personnel.

La douleur peut également s'exprimer de façon plus spécifique :

- Postures antalgiques, exp : suppression de l'appui d'un membre douloureux, dos voûté lors de douleur du rachis,
- Lenteur ou difficulté à effectuer un mouvement : difficulté à se lever (douleur articulaire, osseuse ou viscérale).
- Activations neuroendocriniennes : activation du système nerveux autonome (se traduit souvent par une tachycardie).

❖ **Le stress** est utilisé pour décrire la réponse plus ou moins spécifique de l'organisme face à une situation menaçante.

**1. Au plan comportemental**, un animal stressé pourra réagir par (pendant la manipulation par exp):

- *La fuite ou la tentative de fuite* : réaction très souvent observé chez les animaux lors de la séparation temporaire d'avec le groupe : augmentation de l'activité motrice, vocalisations, tentatives de sortie de la pièce d'isolement (porcs, bovins).
- *L'immobilisation* : chez les oiseaux et chez les jeunes animaux.

**2. Au plan neuroendocrinien** : plusieurs systèmes en sont impliqués:

- *L'activation du système sympathique* : une libération de **catécholamines** (augmentent la fréquence respiratoire, la fréquence et la force des contractions cardiaques, elles augmentent la glycolyse hépatique et la lipolyse... L'activation de l'axe corticotrope (hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien) aboutit à la libération de **glucocorticoïdes** (augmentant la néoglucogénèse et favorisent l'action des catécholamines sur les vaisseaux). D'où la nécessité de limiter le stress.
- *D'autres systèmes neuroendocriniens* peuvent être impliqués dans les réactions de stress. Exp : la prolactine et la bêta-endorphine (en liaison avec l'axe corticotrope) qui sont libérées dans les situations de stress aigue.

**« Le stress et la douleur modifient l'état physiologique de l'animal. Ils doivent donc être limités et contrôlés lors d'expérimentations afin d'obtenir des résultats exploitables. »**

❖ **L'évaluation de la souffrance animale** : Chez l'Homme, la douleur ressentie par un patient peut être décrite verbalement. Des questionnaires, comme le **Mc Gill Pain Questionnaire**, ont été développés pour apprécier la douleur. Ces outils ne sont bien entendu pas utilisables chez l'animal.

## ❖ **Indicateurs de la douleur et du stress chez les animaux de laboratoire**

### • **Modifications de l'activité**

- *Diminution* de l'activité générale : en particulier des activités alimentaires et du toilettage, immobilité

- anomalies du cycle *veille/sommeil* ; - activité tournée vers la région douloureuse : léchages, mutilation

- particularités : ingestion de litière ou des nouveau-nés (rongeurs, lapin), animal couché en rond de façon persistante (rongeurs), tête tournée vers le fond de la cage (lapin), queue entre les jambes (chien), membres et tête repliés (chat), tête en avant et bras autour du corps (singe)

• **Vocalisations** : selon les espèces, elles vont des **cris aigus** (rongeurs, lapin, cobaye), aux **plaintes** (chien, chat), **sifflements et soufflements** (chat), et **hurlements** (singe)

### • **Modifications de la réactivité**

- *agitation* ou au contraire *apathie*, - *agressivité* ou au contraire plus grande *docilité* (chien et chat : posture de soumission), - apparence *anxieuse* (crainte lors de la manipulation, fuite)

### • **Autres modifications d'aspect**

- perte de poids, oreilles pliées (chats), grimaces (singes), torsion de l'abdomen (souris), mictions fréquentes (chien)

• **Modifications motrices** : Retrait d'un membre, sursauts, contractures, augmentation du tonus musculaire



- **Modifications végétatives**

- circulatoires : tachycardie, augmentation de la pression artérielle, ...
- respiratoires : respiration rapide et superficielle avec grognements à l'expiration,
- sécrétions des yeux et du nez (lapin), sudation, salivation (chien)
- pilo-érection, dilatation de la pupille, variation de la température cutanée

❖ **Chirurgie** : est une pratique qui porte atteinte à l'intégrité physique par l'incision. Elle se déroule sous anesthésie *locale, régionale* ou *générale*.

- *Les interventions chirurgicales mineures* : exp. la pose de cathéters ou de capteurs dans des tissus sous-cutanés ou musculaires ou pour la réimplantation d'embryons dans des femelles pseudo-gestantes.
- *Les interventions chirurgicales majeures* : exp. la pose d'appareillage intra-abdominal ou intra-thoracique ou pour la recherche dans le domaine chirurgical. Leur caractère invasif peut entraîner des douleurs postopératoires importantes si elles ne sont pas réduites par l'utilisation d'analgésiques.

- ❖ **Les Analgésiques**

L'antalgie est un terme qui signifie la diminution de la douleur en réponse à une stimulation douloureuse. Les **analgésiques** (ou **antalgiques**) : médicaments qui soulagent ou suppriment la douleur sans entraîner, au contraire des anesthésiques, de perte des sensations ou de la conscience. Selon leur impact, on divisera les médicaments de la douleur en deux groupes :

- ceux qui agissent sur le SNC = morphiniques, antagonistes, tricycliques.
- ceux qui ont une action périphériques = Salicylés.

**a- Les antalgiques centraux ou opioïdes** : Les analgésiques morphiniques sont le plus souvent des opiacés, c'est-à-dire des dérivés de la morphine (donc de l'opium). En l'absence de précautions suffisantes, ils font courir un risque de dépendance s'ils sont consommés hors le cadre du traitement d'une douleur forte.

**Exemple : La morphine (De Morphée** : Dieu des Songes, fils de la Nuit et du Sommeil)

La morphine est l'antalgique central de référence. Elle se fixe aux récepteurs opiacés présents dans le système nerveux central et prend ainsi la place des peptides endogènes, enképhalines et endorphines, inhibiteurs de la transmission de la douleur.

Pour la morphine toutes les voies sont utilisables : *orale; sous-cutanée; intra-veineuse* (ex pour calmer la douleur de l'infarctus du myocarde)...etc

**Propriétés pharmacologiques :** *Action analgésique, psychomotrice, respiratoires ; action sur le centre du vomissement, Système Nerveux Autonome, sur les muscles lisses : (spasme, Tube digestif, Voies biliaires, Voies urinaires) ; sur l'œil, Rein et diurèse, ....*

**b- Les antalgiques périphériques purs ou non morphiniques :** agissent principalement en bloquant la synthèse des prostaglandines (molécules responsables de la sensibilisation des nocicepteurs (récepteurs sensoriels spécifiques de la perception de la douleur). Ces molécules appartiennent à trois familles pharmacologiques distinctes : *antalgiques purs, analgésiques antipyrétiques* (paracétamol, substance la plus employée dans le monde), *anti-inflammatoires non stéroïdiens* (l'aspirine, ibuprofène et kétoprofène).

**Propriétés pharmacologiques :** Antalgiques d'effet rapide, Antipyrétique, pas ou très peu anti-inflammatoire.

❖ **Les anesthésiques :**

✓ **Les anesthésiques locaux**

Les anesthésiques locaux sont des substances qui bloquent les canaux sodiques qui transmettent l'influx nerveux. Ils se répartissent en 2 familles : les aminoesters (procaïne, tétracaïne) et les aminoamides (lidocaïne, mépivacaïne, bupivacaïne, ropivacaïne, articaïne).

- Les anesthésiques locaux amides sont commercialisés sous deux formes : adrénalinées contenant un conservateur, et non adrénalinées, ne contenant ni conservateur ni antioxydant.

- Les anesthésiques locaux de puissance faible (lidocaïne, prilocaïne et mépivacaïne) ont un délai d'action court (5 à 10 min selon le site) et une durée d'action de 1h 30 à 2 h. Les anesthésiques locaux les plus puissants (ropivacaïne et bupivacaïne) ont un délai d'action plus long (10 à 20 min) et une durée d'action de 2h 30 à 3h30.

Les anesthésiques locaux sont destinés à agir au site d'injection, et c'est donc leur concentration locale qui est responsable de l'effet observé. La résorption systémique est une étape de leur élimination, permettant leur métabolisme ultérieur.

La vitesse d'apparition de l'anesthésique local dans le sang est fonction du site d'injection. L'apparition est plus rapide dans les zones céphaliques bien vascularisées qu'au niveau des membres inférieurs.

## ✓ **Anesthésiques volatiles**

- **Ether** : très longtemps largement utilisé, l'éther est pratiquement abandonné du fait d'une part de son caractère inflammable, donc dangereux et d'autre part de la qualité médiocre de l'anesthésie qu'il procure, s'accompagnant d'effets irritants sur l'appareil respiratoire.
- **CO2** : l'utilisation de CO2 en proportion 50/50 avec de l'oxygène peut induire une anesthésie de courte durée indiquée par exemple pour le prélèvement de sang au sinus rétro-orbitaire.
- **Méthoxyflurane** : peut être utilisé en remplacement de l'éther dans des dispositifs peu coûteux (cloche de verre ou vaporisateurs).

## TD n°3 : Tests *in vivo* (Administration de substance)

### Tests des substances analgésiques

L'étude de l'action analgésique se réalise par la mesure de la disparition des réactions objectives (fuite, cri, retrait) manifestées par l'animal à la suite de stimuli douloureux, celui-ci peut être **thermique, électrique, mécanique ou chimique** (il faut tenir compte du seuil de la sensation douloureuse).

✓ **Test de Siegmund** : Ce test consiste en premier à créer une douleur chez des souris de 20-22g, par injection (voie intra péritonéale) de 0.25ml d'une solution d'acide acétique. La douleur se manifeste par des crampes abdominales. Le nombre des crampes abdominales est compté après 15 min de l'administration de la solution dans un intervalle de temps de 30 minutes. Ces crampes se traduisent par l'étirement des pattes postérieures et/ou le frottement du ventre. Ensuite trois lots d'animaux sont préparés :



- *Le lot 1<sup>e</sup>* : les témoins; auxquelles l'eau physiologique est administrée.
- *Le lot 2* : souris traitées par la substance de référence (paracétamol), administrée per os.
- *Le lot 3* : souris traitées par la substance à tester, administrée per os.

Chez les souris du lot 3, le nombre des contorsions observées est comparé à celui des témoins et des traités par la substance de référence. Le pourcentage d'inhibition est calculé comme suit : Le pourcentage d'inhibition =  $[(A-B)/A] \cdot 100$

A=nombre de contorsions observées chez les témoins ; B=nombre de contorsions observées chez les traités.

✓ **Test d'Amour et Smith** : Une souris de 20g est introduite dans un tube PVC clos d'une extrémité, de tel sorte à laisser une partie de la queue à l'extérieur de la deuxième extrémité. A l'aide d'une lampe de 300 watts localisés à 20 cm au-dessus de la queue, un faisceau lumineux sera focalisé par un entonnoir. L'animal répond par la rétraction ou le déplacement de sa queue. Les animaux témoins (lot 1) sont ceux qui répondent dans un temps de 5 à 6 secondes.



*NB : il ne faut surtout pas dépasser un laps de temps de 10 secondes sinon on risque de brûler la queue.*

La substance à tester est administrée aux animaux (lot 2), et si cette substance a un effet analgésique, la réponse des animaux au stimulus est supérieure à 6 sec. Des points sont attribués aux différentes réponses, de telle sorte que :

- 1 point pour une réponse de 7-7.5 sec ; 2 points pour une réponse de 8-8.5 sec ;
- 6 points pour une réponse de 9-9.5 sec ; 10 points pour une réponse à 10.5 sec.

Le total des points donne le degré d'analgésie par rapport à la substance de référence.

✓ **Test de Bell et Tislow** : Ce test est réalisé sur des rats mâles de 150 g. La douleur est provoquée par l'administration de 0.2 ml de nitrate d'argent à 1%, au niveau de l'articulation du genou. Ceci permet de créer une douleur arthritique. Après 18h, le genou des rats est manipulé 3 fois à 10s d'intervalles. La réponse des rats se manifeste par des cris. Après une période de repos, la substance supposée analgésique est administrée. Le même test est réalisé et si cette substance a un effet, les rats crient peu ou pas. Ce test est effectué en parallèle avec la molécule de référence (paracétamol) dans les mêmes conditions.

✓ **Test de Radouco** : Ce test est réalisé sur des cobayes. Un trou est effectué au niveau des incisives jusqu'à la pulpe dentaire de telle sorte que deux électrodes peuvent être introduites. Ces dernières sont reliées à un condensateur. La douleur est provoquée par une décharge électrique qui se manifeste par un cri (témoin).

Cette dernière est sans effet sur les animaux traités par la substance soupçonnée analgésique et pour cela cette intensité sera augmentée graduellement jusqu'à l'obtention du cri.

✓ **Test de la plaque chauffante** : Ce test est réalisé sur des souris. Il consiste à placer des souris au-dessus d'une plaque chauffante à 56°C. Dès que la souris perçoit la chaleur, elle se met sur les pattes derrière et lèche les pattes avant. Le temps que met la souris pour sentir la chaleur est noté. Si l'administration de la substance à tester augmente le temps de perception de la chaleur, alors elle sera considérée comme analgésique. Et le même test est réalisé avec une molécule de référence (paracétamol).

*NB : Il faut toujours associer au test des analgésiques, un test antipyrétique et anti-inflammatoire (trilogie).*

## **TD n°4 : Tests *in vivo* (Administration de substance)**

### **Tests des substances antipyrétiques et anti-inflammatoires**

#### **1. Tests des substances antipyrétiques**

**a- Technique de peptone de viande :** Ce test est réalisé sur des lapins. Il consiste à élever la température de l'animal par l'administration de 0.1 ml/kg de peptone de viande à 1% par voie intraveineuse. 3 lots seront préparés

- *Lot 1* : témoins traités par le sérum physiologique ;
- *Lot 2* : lapins traités par la substance à tester ;
- *Lot 3* : lapins traités par la substance de référence (paracétamol).

10 min après, la peptone de viande est injectée aux lapins des trois lots et la température rectale est mesurée toutes les heures pendant 5 h. Si cette substance présente un effet anti-pyrétique, la température des animaux du deuxième lot est moins élevée que celle des témoins.

**b- Technique de levure de bière :** L'injection sous cutanée d'1 ml /100g d'une suspension aqueuse de levure de bière à 20% dans la région dorso-lombaire provoque chez un animal une réaction de fièvre (la levure une fois dans le sang va se gonfler et provoquer une inflammation). Ce test est réalisé sur des souris de 200g mises à jeun de 16h. Les mêmes étapes de la technique de peptone de viande seront suivies, sauf que la façon d'induire la fièvre est réalisée par la levure de bière.

#### **2. Tests des anti-inflammatoires**

**a. Test de winter :** Ce test est réalisé sur des rats femelles de 120 g. L'inflammation dans ce test est provoquée par l'injection d'une solution de carragénine 1% (une poudre d'algue avec des propriétés gonflantes) dans la patte de l'animal. La mesure de l'enflure de la patte est effectuée par pléthysmomètre, pendant 3 h à 30 min d'intervalle.

De la même manière que pour les tests des analgésiques, trois lots seront préparés :

- *Lot 1* : rats témoins, traitées par le sérum physiologique (par voie orale);
- *Lot 2* : rats traitées avec la substance à tester.
- *Lot 3* : rats traitées avec une substance de référence.

30 min après cette opération, la carragénine est injectée aux rats des trois lots, et si la substance testée est anti-inflammatoire les rats du lot 2 auront peu ou pas d'inflammation. L'action anti-inflammatoire de la substance à tester peut être directe ou

via la sécrétion du cortisol par la médullosurrénale. Pour cela, le test doit être répété en l'absence des surrénales (qui vont être enlevées par chirurgie). Et si les mêmes résultats seront obtenus, alors la substance testée possèdera des propriétés anti-inflammatoires.

**b. Test de shanann :** C'est un test qui ressemble au test de Winter sauf que la substance à tester soit mélangée avec la carragénine en une seule solution, et injectée à l'animal.

**c. Test par traumatisme expérimental :** Ce test est réalisé sur des rats de 125g. Une bille, à une hauteur donnée, est lancée au-dessus de la patte d'un rat, ceci permet de produire un abcès. Cet abcès est prélevé et pesé. Si la substance à tester a un effet anti-inflammatoire, l'abcès est moins volumineux.

**d. Test des substances contre la polyarthrite :** Il consiste à créer une polyarthrite par l'administration de l'adjuvant de freud (ampoule de bacilles tuberculeux tués à 0.5% + l'huile ordinaire) en sous-cutané. La polyarthrite s'installe au bout de 15 jours, et se manifeste par une difficulté à marcher et des cris de l'animal au moindre touché.

Le test est facile à réaliser, il suffit d'administrer la substance à tester quotidiennement et de suivre l'amélioration de l'état de l'animal.

*NB :* Il est indispensable de vérifier l'activité ulcérogène lors du test du médicament anti-inflammatoire.

## TD n°5 : Tests *in vivo* (Administration de substance)

### 1. Les antihistaminiques

L'histamine est un médiateur présent dans de nombreux tissus (mastocytes, intestins, estomac, foie, peau, plaquettes sanguines, leucocytes, basophiles....) responsable des phénomènes de l'hypersensibilité de type 1 (éternuements, détresse respiratoire.....). Les antihistaminiques sont des substances qui inhibent ou suppriment les actions de l'histamine, en entrant en compétition avec celle-ci au niveau des récepteurs. Ils sont utilisés pour le traitement des états allergiques.

❖ **Tests** : Ce test est réalisé sur des cobayes.

- l'iléon de cobaye est prélevé, mis dans une cuve à organe isolé et sera connecté à un stylet inscripteur. 220µg/l d'histamine est introduite dans le milieu ;

L'apparition des symptômes allergiques est signalée par la présence des pics sur le graphe. L'addition d'un antihistaminique fait disparaître les pics.

- Un autre test peut être réalisé de la manière suivante : L'animal est mis sous une cloche en verre fermée, dans laquelle l'histamine est pulvérisée. Le temps depuis l'introduction de l'animal jusqu'à ce qu'il se met sur le côté (signe de détresse respiratoire), est mesuré. Le lendemain, les mêmes étapes sont réalisées avec l'antihistaminique. Si l'animal met plus de temps pour se mettre sur le côté, alors la substance a un effet.

### 2. Les antitussifs

La toux est un acte réflexe déclenché par les afférences laryngées et vagales dont le but est de protéger l'arbre trachéo-bronchique. Elle commence par un effort inspiratoire ou expiratoire à glotte fermée, suivi de l'expulsion vigoureuse de l'air. La toux a pour origine des stimuli mécaniques (récepteurs à adaptation rapide localisés au niveau de l'opéron bronchique) déclenchant l'expiration comme dans la fausse déglutition, ou l'irritation par des poussières, la toux évoquée par des vapeurs irritantes commence par une inspiration forcée, elle est sujette à des répétitions.

Les antitussifs sont des médicaments qui calment, soulagent ou suppriment la toux. Suivant le mode d'action des antitussifs on distingue :

- ✓ les dépresseurs du centre de la toux,
- ✓ les bronchodilatateurs,
- ✓ les produits suppriment l'irritation au niveau de centres reflexogènes,

✓ les produits supprimant la cause de l'irritation au niveau des zones reflexogènes.

❖ **Test** : Le test est réalisé chez un chien sous anesthésie générale.

Sur la paroi trachéale, fixer deux vis de 10 à 15 cm de distance, relier les par un fil élastique, placer une lame métallique sur ce dernier et recoudre l'animal. Provoquer la toux par un aimant (qui attire la plaque). Vérifier l'activité d'une substance antitussive par l'absence de la toux.

### 3. Tests des antiulcéreux

L'**ulcère** est caractérisé par une acidité gastrique. Le suc gastrique contient un acide chlorhydrique, une protéase « la pepsine » et une mucine protectrice de la muqueuse gastrique. La sécrétion de ce suc est sous la dépendance de facteurs psychiques, de facteurs nerveux et de facteurs chimiques (la gastrine, l'histamine et l'acétylcholine). Le traitement de l'ulcère vise à lutter contre l'hyperchlorhydrie, soit chimiquement par des substances neutralisant l'acidité gastrique, soit physiologiquement en agissant sur le stimulus nerveux responsable de la sécrétion acide.

- **Test 1 Ulcère de stress** : Une situation de stress est provoquée chez un animal à jeun (16h), qui est mis dans un corset, en le suspendant pendant 7 à 8h. Ensuite, le rat est sacrifié, son estomac est prélevé et l'activité ulcéroïde est mesurée. Un estomac plein d'acide indique un ulcère.

- **Test 2 Ulcère de jeun** : Un animal soumis à un jeun pendant 3 jours, est sacrifié. Son estomac est prélevé et le volume du pH est mesuré (un taux élevé des ions H<sup>+</sup>).

- **Test 3 Ulcère à l'histamine** : L'histamine est administrée par voie intraveineuse pendant 2 jours. Une laparotomie et une ligature du pylore sont effectuées. 3h après la fermeture, l'animal est sacrifié. Le test est accompli par une ligature du cardia.

Une mesure de l'indice d'ulcère est effectuée par comparaison des trois groupes ayant reçu respectivement l'eau physiologique, la substance de référence (*omeprazole*), et la substance x.

## TD n°6 : Tests *in vivo* (Administration de substance)

### 1. Les anti-spasmodiques

Un **spasme** est une contracture musculaire involontaire, intense mais passagère. Le terme spasme est réservé à la contraction des muscles lisses (muscles automatiques), contraction de nature convulsive.

**Les antispasmodiques, ou spasmolytiques** : médicaments qui suppriment la contraction des fibres musculaires lisses. On distingue :

- **Antispasmodiques *musculotropes*** (papavérine): agissant directement sur la fibre lisse.
- **Les spasmolytiques *neurotropes*** : agissant sur l'innervation des muscles. Ce sont des substances couramment utilisées pour soulager les spasmes du tube digestif (crises de coliques hépatiques) ainsi que ceux de l'appareil urogénital (crises de coliques néphrétiques).
- **Les médicaments atropiniques** : ont des propriétés antispasmodiques, leur effet antispasmodique de propriétés dites musculotropes

- Les spasmes les plus rencontrés sont :

**a. Colique hépatique** : Lorsque les lithiases biliaires (calculs) ont une certaine grosseur, elles peuvent se déposer au fond de la vésicule biliaire. Lorsque la vésicule se contracte pour chasser la bile vers l'intestin, elle tente aussi d'expulser les lithiases qui vont s'engager dans le canal qui mène au tube digestif. Etant relativement volumineux, il va se coincer dedans et bloquer ou ralentir l'évacuation de la bile. Cette tentative d'expulsion cause une douleur vive du côté droit, en bas des côtes, qui irradie parfois jusqu'à l'épaule et dans le dos, entre les omoplates. Elle s'accompagne parfois de nausées et de vomissements; peut s'accompagner d'ictère (jaunisse), de selles pâles et d'urines foncées et d'une colique hépatique. La douleur cesse généralement lorsque la lithiase retombe au fond de la vésicule.

**b. Colique néphrétique** : La colique néphrétique est provoquée par la  *brusque distension* de la capsule périrénale et/ou de l'uretère secondaire à un  *obstacle urétéral aigu* (un obstacle chronique est souvent indolore, asymptomatique). La douleur, de début brutal, siège dans la fosse lombaire, elle est unilatérale, ce qui permet de préciser le rein qui souffre. Cette douleur, souvent très violente, évolue par paroxysmes (à type

de broiements) sur un fond continu et une pesanteur lombaire.

\* Les médicaments sont répartis en deux variétés :

- **Musculotrope** qui a une action sur le muscle.
- **Anticholinergique** qui inhibent l'action de système nerveux végétatif (autonomes, automatique). Les antispasmodiques diminuent les spasmes d'origine musculaire, concernant les muscles composant la paroi des organes creux (estomac, intestin etc.). Ils ont également une action antalgique (ils suppriment la douleur) associée aux spasmes. Cette variété de médicament est utilisée par voie orale (comprimés) et sous forme injectable. Leur indication principale est bien entendue les spasmes d'origine digestive (estomac, bile, colon), concernant l'appareil génital (utérus, vagin), l'appareil urinaire (vessie).

L'atropine et les anticholinergiques (ayant une action contre l'acétylcholine, neuroméiateur du système nerveux) sont les antispasmodiques les plus utilisés.

On associe également un régime hydrique abondant (2 à 3 litres d'eau par jour). On fait également appel aux médicaments antalgiques (antidouleur) contenant du paracétamol, aux morphiniques (morphine), aux anti-inflammatoires (profenid), et aux antispasmodiques (spasfon).

La surveillance passe par :

- le suivi des crises douloureuses et d'une éventuelle expulsion du calcul. Pour cela il est nécessaire de filtrer les urines.
- La température et la diurèse (émission d'urine) sont également contrôlées.
- L'échographie est répétée si nécessaire.

**NB** : Les antispasmodiques musculotropes comme le phloroglucinol (SPASFON), le pinavérium (DICÉTEL), la mébévérine (DUSPATALIN) et la trimébutine (DEBRIDAT) semblent agir par effet anticalcique. Ces antispasmodiques sont prescrits pour traiter les coliques hépatiques, les coliques néphrétiques, les colopathies et les dysménorrhées.

❖ **Test des Antispasmodiques** : Ce test est réalisé sur des rats à jeun.

Un morceau d'intestin (3-4cm) est prélevé, il est mis dans un bain nourricier. L'extrémité supérieure de cet intestin est reliée à un stylet inscripteur; ce dernier permet d'enregistrer les mouvements péristaltiques.

L'introduction de l'acétylcholine dans le bain nourricier provoque des contractions (spasmes) qui se traduisent par l'apparition d'un pic sur le graphe. L'ajout de l'atropine empêche l'effet de l'acétylcholine et minimise les spasmes (pics insignifiants).

De la même façon, la substance supposée antispasmodique sera introduite dans le bain et si elle a un effet, le même résultat est obtenu (ou résultat similaire).

**Remarque :** ce test n'est pas réalisable chez de lapins à cause de la présence de l'atropine estérase.

## 2. Les cholagogues et cholérétiques

La *bile* est une solution jaune-brunâtre, ou vert-olive dont le pH est compris entre 7,6 et 8,6. Elle ne renferme pas d'enzymes. La bile est principalement formée d'eau et renferme: *acides biliaires, sels biliaires* qui favorisent l'absorption des graisses, pigments biliaires, cholestérol, phospholipides, la lécithine (phospholipide aminé que l'on trouve en abondance dans le jaune d'oeuf et dans certaines huiles et qui a des propriétés émulsifiantes), divers électrolytes ou ions. La bile est élaborée initialement dans des cellules parenchymateuses hépatiques (hépatocytes), puis modifiée par les activités de sécrétion et de réabsorption des cholangiocytes (cellules épithéliales biliaires).

### Rôle de la bile:

- agent émulsifiant des graisses, certainement son rôle le plus important;
- facilite aussi l'absorption des lipides et du cholestérol.
- De nombreuses substances sécrétées dans la bile (comme la bilirubine, un déchet du métabolisme de la partie hème de l'hémoglobine) quittent l'organisme par les fèces.

Si la bile demeure trop longtemps dans la vésicule biliaire, le cholestérol qu'elle contient peut cristalliser et former des calculs biliaires pouvant causer des douleurs intenses.

\*Les cholagogues stimulent la libération de la bile stockée dans la vésicule

\*Les cholérétiques augmentent la sécrétion biliaire du foie et facilitent la digestion.

### ❖ Tests des Cholagogues : Ce test est réalisé chez des lapins.

Chez un lapin sous anesthésie générale, le canal hépatique est ligaturé de telle façon que le volume de la bile provenant du foie soit minimisé, puis un cathéter est implanté au niveau de la conduite cholédoque afin de récupérer la bile après réveil de l'animal.

La substance à tester est administrée et la quantité de la bile est récupérée. Si la substance a un effet cholagogue elle permet le vidange vésiculaire et facilite l'excrétion de la bile, donc le volume récupéré est plus important que le volume récupéré au début.



❖ **Test des cholérétiques** : Pour tester les substances cholérétiques, la même procédure est suivie sauf que dans ce cas la ligature se fasse au niveau du canal cystique. Si la substance est cholérétique elle agit sur le foie et fait augmenter la sécrétion de la bile, donc le volume récupéré est plus important que le volume récupéré au début.

### 3. Les anti-diarrhéiques

❖ **Test** : Pour suivre le transit intestinal d'une substance donnée et voir son effet thérapeutique, le test suivant est réalisé :

Deux lots de souris sont préparés :

- *Lot 01* : témoin, contient des souris auxquelles il sera administré la gomme arabique additionnée au noir animal (20%).
- *Lot 02* : contient des souris auxquelles il sera administré la gomme arabique additionnée au noir animal (20%) et la substance à tester.

*NB : la gomme arabique provoque la diarrhée et le noir animal est utilisé juste pour colorer.*

Après 30 min, l'animal est sacrifié, son intestin est prélevé et étalé d'une façon perpendiculaire sur un mur muni d'une règle graduée. Si la substance a un effet, les selles des animaux du lot 2 sont retenues par rapport à celles des témoins (ceci est observé bien par l'écart des zones colorées apparues dans les intestins suspendus).

## **TD n°7 : Tests *in vivo* (Administration de substance)**

### **1. Diabète induit par la streptozotocine :**

Le diabète sucré peut être induit chez l'animal par différentes techniques dont l'injection de la STZ qui est largement utilisée (La STZ est un glucosamine nitrosé) qui entraîne un effet cytotoxique sélectif des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Le mécanisme d'action de cet agent diabétogène reste encore mal connu. Cependant, les études antérieures ont montré son action sur les îlots de Langerhans en réduisant la masse des cellules  $\beta$  et par conséquent une insulinopénie caractéristique d'une hyperglycémie chronique ou transitoire. Le glucose qui constitue la molécule de la STZ permet sa pénétration dans les cellules  $\beta$  pancréatiques à travers les transporteurs de glucose GLUT2. En plus de son impact sur le métabolisme des hydrocarbures qui est bien étudié, la STZ provoque une altération du métabolisme glucidique, lipidique et protéique due à la défaillance en insuline par l'effet indirect de cette toxine sur la signalisation de l'insuline. L'hyperglycémie chronique est à l'origine d'une insulino-résistance résultante d'une diminution d'autophosphorylation du récepteur de cette hormone ; elle active l'expression de la protéine kinase C, une protéine responsable de la déphosphorylation du récepteur de l'insuline. De plus, l'injection de la STZ est à l'origine d'une chute de poids

❖ **Test :** La dose choisie de la STZ est variable selon la voie d'administration, l'animal et surtout la pathologie voulue. Par exemple, dans les essais préliminaires, il est important de garder la vitalité de l'animal où on injecte de faibles doses de STZ (dose inférieure ou égale à 60mg/kg) par injection intrapéritonéale de Streptozotocine (STZ), préparée fraîchement dans une solution tampon de citrate (0.1 M, pH 4.5)

### **2. Les antihypertenseurs**

L'hypertension est un syndrome multifactorielle dont la traduction clinique est de nature hémodynamique, due à la réactivité intrinsèque du patient (désordre physiologique) et à ses habitudes comportementales. Dans 90% des cas la cause précise de l'hypertension artérielle n'est pas identifiée, ce type est appelé HTA essentielle.

L'hypertension artérielle se définit comme la persistance d'une pression artérielle de 140/90 ou plus ; la paroi s'épaissit, devient plus rigide, moins élastique, plus scléreuse. La lumière du vaisseau se rétrécit. Les cellules musculaires lisses se

modifient, et la paroi remplit toutes les conditions favorables à l'éclosion de l'athérome, autre lésion grave du système artériel. L'HTA favorise l'athérosclérose et celle-ci fait le lit de l'hypertension.

Les **antihypertenseurs** sont des médicaments qui font baisser la tension artérielle sans toucher à la cause de la maladie. Ces médicaments doivent être administrés au long cours et à doses suffisantes pour ramener les chiffres tensionnels à la normale. On a souvent recours à l'association de plusieurs antihypertenseurs.

- Les antihypertenseurs se regroupent en *4 familles principales* : les diurétiques, les bêta-bloquants, les inhibiteurs calciques (ICA), les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) et en *3 familles secondaires* : les alpha-bloquants, les antihypertenseurs à action centrale, les vasodilatateurs à action directe

❖ **Test** : Des souris SHR (génétiquement hypertendus) ou rendus hypertendus sont utilisées. Chez ces derniers, une ischémie rénale est provoquée (Lorsque le rein souffre (ischémie rénale), il secrète une enzyme « la rénine » qui se dirige vers le foie, où elle se lie avec l'angiotensinogène. Une enzyme de conversion transforme ce complexe en angiotensine responsable de la vasoconstriction).

-**Induction de l'HTA** : l'animal est anesthésié par l'éther. Une laparotomie est effectuée. Le diamètre de l'artère d'un seul rein est diminué avec une pince, ce dernier est s'arthropie et le rat devient hypertendu.

- Chez un rat jeune anesthésié, une partie de la peau dorsale est coupée, la DOCA (désoxycorticostérone) est appliquée à ce niveau. La pression artérielle augmentera progressivement (inconvenient : renouveler l'application mensuellement).

- L'HTA saline est créée par l'administration de l'eau salée, en respectant la même quantité de sel. L'HTA est mesurée au niveau de la queue de l'animal, après l'avoir frottée un peu. La substance x et la substance de référence sont administrées, la mesure de la pression artérielle se fait périodiquement pour montrer l'efficacité de l'antihypertenseur.

### 3. Les diurétiques

Les traitements diurétiques augmentent l'élimination urinaire de sodium en agissant à différents niveaux de la surface luminale (pôle urinaire) des cellules du tubule rénal. Il en résulte la diminution de la volémie et de la surcharge sodique de l'organisme (traitement de l'hypertension artérielle et de l'insuffisance cardiaque). Au début, les

diurétiques réduisent la pression artérielle en réduisant le volume sanguin et le débit cardiaque.

❖ **Test des diurétiques** : Ce test est réalisé chez des souris, soumis à un jeun hydrique de 16 h. Deux lots de souris sont préparés.

- *Lot 01* : témoin, souris traitées de sérum physiologique (50 ml/kg).
- *Lot 02* : souris traitées par la substance soupçonnée diurétique (par voie intragastrique) puis par 50 ml/kg de sérum physiologique.

Les animaux des deux lots sont mis dans des cages métaboliques. Ensuite, la quantité des urines est mesurée pendant 6 h à 1heure d'intervalle. L'excrétion urinaire volumétrique est calculée comme suit :

**$EUV = (\text{volume recueilli}/\text{volume administré}) \times 100.$**

Si la substance est diurétique, les animaux du lot 2 urinent plus que les témoins.

## TD n°8 : Tests *in vivo* (Administration de substance)

### 1. Les anti-parkinsoniens

La **maladie de Parkinson** est une maladie neurologique affectant le système nerveux central responsable d'anomalies motrices d'évolution progressive. On sait que certaines substances (les insecticides), favorisent la maladie. Les signes cliniques sont liés à une perte des neurones du locus niger (ou *substance noire*) et à une atteinte des faisceaux nigro-striés.

Cette maladie est caractérisé par le *dérèglement du système dopaminergique* (déficit de dopamine : un neurotransmetteur, molécule servant de messenger chimique entre deux neurones, synthétisée dans une terminaison axonale, libéré dans la fente synaptique en réponse à un influx nerveux) qui n'exerce plus de rétrocontrôle négatif sur la production d'acétylcholine entraînant un déséquilibre dopamine - acétylcholine.

Les altérations cérébrales ne se limitent pas seulement à la sphère dopaminergique et de nombreux systèmes neurotransmetteurs (sérotoninergique ou encore adrénérgiques) sont également atteints.

Il n'existe pas de traitement étiologique de la maladie de parkinson, mais un traitement symptomatique permet d'améliorer les troubles.

- ❖ **Test (induction de la maladie)** : provoquée par l'introduction de la MPTP (1.méthyl, 4 phenyl, 1 2,3 ,6 tetrahydropyridine).

### 2. Les anti-convulsivants

L'épilepsie est une maladie du système nerveux. Elle traduit une *hyperexcitabilité* du cortex cérébral et le développement d'un foyer présentant un état d'hypersynchronie. L'existence de ce foyer résulte d'une lésion du tissu nerveux d'origine pathologique ou accidentelle.

Le tissu cérébral épileptique présente une diminution de sa teneur en acétylcholine et en acide glutamique (fournit sous l'action de la décarboxylase glutamique le GABA, qui est doué des propriétés inhibitrices et par la-même anti-épileptiques). L'inhibition de la décarboxylase glutamique par la *thiosemicarbazide* s'accompagne de crises épileptiques liées à une chute de 30% de la teneur du cerveau en GABA.

❖ **Test (Induction des crises convulsives)** : La crise convulsive est provoquée par l'administration de la strychnine (2mg/Kg) Ou par excitation (par des clefs ou des cloches) à l'oreille d'un rat jusqu'à ce qu'il crie.

### 3. Les psychotropes

Le terme psychotrope désigne des substances dont le tropisme est psychique. Les psychotropes sont des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle, qui ont un tropisme psychologique, c'est-à-dire qui sont susceptibles de modifier l'activité mentale sans préjuger du type de cette modification.

On distingue trois principaux groupes :

#### a- Les Psycholeptiques ou sédatifs :

- *Les Hypnotiques* : ils produisent, selon les composés ou les doses utilisées, un sommeil plus ou moins physiologique.
- *les Anxiolytiques* : ont comme cibles privilégiées *l'anxiété et la tension émotionnelle* : les plus utilisés d'entre eux appartiennent actuellement à la famille des benzodiazépines qui possèdent en commun cinq propriétés : sédatrice, anxiolytique, myorelaxante, anti-convulsivante et amnésiante, à des degrés divers.
- *Les Neuroleptique* ; caractérisés par de puissantes activités thérapeutiques dans les *psychoses* et par leur aptitude à produire une *symptomatologie neurologique* : extrapyramidale et neuro-endocrinienne.

#### b-Les Psychoanaleptiques, stimulants du tonus mental ;

- *Nooanaleptiques* « Les stimulants de la vigilance » : Antagonistes des hypnotiques, ce sont des *amines d'éveil* (amphétamine). Leurs actions stimulantes sur l'activité intellectuelle, l'éveil, l'asthénie, s'accompagnent d'accoutumance et de dépendance, voire de pharmacopsychoses...
- *Thymoanaleptiques* « les régulateurs de l'humeur » : Médicaments dont les prototypes sont les *sels de Lithium* et la *carbamazépine (Tégréto)*, leur originalité principale est leur *action préventive à l'égard des deux phases ; expansive ou dépressive, de la Psychose Maniaco-Dépressive (Trouble bipolaire)* et leur action curative sur les états maniaques. Certains Psychiatres considèrent les thymorégulateurs comme une classe autonome de psychotropes.
- *Antidépresseurs* : L'originalité de ces molécules est précisément leur action sur les états de dépression de l'humeur.

- *Psychostimulants* ; ils appartiennent au groupe précédent, avec effet moins dangereux: on peut y classer la caféine, les dérivés phosphoriques, l'acide ascorbique.

**c. Les psychodysléptiques** : Ils dévient ou perturbent l'activité psychique.

❖ **Tester un Hypnotique** : Après avoir administré l'hypnotique, le réveil de l'animal endormi est possible (tandis qu'en anesthésie c'est impossible).

❖ **Tester un Anxiolytique** : La névrose est provoquée chez un chat

- *1<sup>ère</sup> procédure* : apprendre à un chat (enfermé dans une cage spéciale) d'appuyer sur une pédale pour avoir la nourriture, cela pour une période de temps jusqu'à ce qu'il acquiert le réflexe, « appuyer- avoir la nourriture ».

- *2<sup>ème</sup> procédure* : il appuie sur la pédale, vous lui appliquez un jet d'air sur le visage.

- Ensuite l'animal est perturbé en lui donnant dans certains cas la nourriture, dans l'autre le jet d'air.

- *3<sup>ème</sup> procédure* : laisser le toujours appuyer pour lui lancer seulement le jet d'air et ainsi il aura développé une névrose.

**Tester un Nooanaléptique** : Test de la planche à trou :

A l'aide d'un crayon, diviser une planche en 4 parties, dans chaque partie pratiquer des trous, poser dessus une souris et laisser là explorer le terrain.

- tester la motilité par la vitesse de déplacement

- tester la curiosité lorsqu'elle introduit son nez dans le trou.

- comparer les résultats par rapport à ceux des témoins, (un nooanaléptique augmente la motilité, un tranquillisant la fait diminuer).

❖ **Test de la cage de Warner** : C'est une cage spéciale dans laquelle les rats peuvent s'introduire, afin qu'ils apprennent une activité.

- L'Amphétamine (1heure par jour pendant 2à3jours) fait augmenter l'activité.

- Un tranquillisant, fait diminuer l'activité.

## TD n°9 : Culture Cellulaire

**Rappel :** C'est le prélèvement de cellules, d'un animal ou d'une plante et leur placement dans un environnement artificiel conduisant à leur croissance. C'est une technique de laboratoire qui consiste à faire vivre des cellules in vitro. L'objectif est de multiplier des cellules ou de les maintenir vivantes pour les utiliser.

### But :

- Matériel en grande quantité
- Conservation des caractéristiques du tissu initial
- Homogénéité des cellules
- Contrôle de l'environnement et de traitements appliqués
- Modèle pour l'étude de la physiologie cellulaire
- Pour la production de: Vaccins, Protéines thérapeutiques (anticorps, agents immunologiques, Hormones), Tissus

### Différents types de culture cellulaire

**a- Culture Primaire:** Lorsque les cellules sont prélevées directement d'un tissu et placées dans un environnement de culture approprié, elles se divisent et prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une Culture primaire ou primoculture.

- Avantage : Proche de la "réalité" de la vie d'une cellule
- Inconvénients :
  - Matériel en faible quantité
  - Mélange de différents types cellulaires
  - Ces cellules ne peuvent être maintenues en culture que pendant quelques générations.

**b- Culture secondaire :** Lorsque les cellules dans le récipient de culture primaire ont poussé et couvert tout le substrat de culture disponible (arrivent à confluence), elles doivent être décollées du support, dispersées et réensemencées à une densité plus faible dans un nouveau récipient de culture avec du milieu frais. Cette opération est appelée: repiquage.

**c- Culture de Lignées Cellulaires :** Une lignée cellulaire est une population homogène de cellules, stables après des mitoses successives, et ayant une capacité illimitée de division (entretien in vitro par repiquages successifs). Il s'agit en général de:

- **Cellules cancéreuses :** cellules prélevées sur une tumeur au départ



- **Cellules saines rendues immortelles** (transformation = cancérisation) par traitement mutagène Chimique, physique ou par utilisation de virus oncogènes

## **Méthodologie**

### **1. Les sources de cellules :**

- Les cellules circulantes (en suspension) : Indépendance vis-à-vis de l'ancrage ; Cellules mises en culture en suspension dans le milieu de culture (avec ou sans agitation). Ex: Sang, moelle osseuse, protoplastes
- Les cellules adhérentes (à partir de tissus ou d'organes) : Dépendance vis-à-vis de l'ancrage ; Nécessité d'être attachées entre elles et ancrées sur un support pour survivre

### **2. Les milieux de culture :**

- Récipients de cultures appropriés (en verre ou en plastique) contenant un milieu qui apporte les nutriments essentiels à la survie et à la croissance.
- Le milieu de culture doit reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement que les cellules trouvaient in vivo:
  - apporter des éléments nutritifs,
  - contribuer au maintien des conditions physico-chimiques telles que pH et osmolarité,
  - permettre la prolifération des cellules (divisions cellulaires).
- **Trois types:**
  - Milieu de culture minimum : Milieu comportant les éléments chimiques (sous une forme utilisable) strictement nécessaires à la croissance de la cellule.
    - L'eau, indispensable à toute forme de vie (eau distillée stérile)
    - Une source de carbone et d'énergie (le glucose)
    - Une source d'azote
    - Des sels minéraux (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; MgSO<sub>4</sub>; MgCl<sub>2</sub>; CaCl<sub>2</sub> ...)
    - Une source d'oligo-éléments (fer, zinc, manganèse, cuivre, cobalt, molybdène)
    - Un pH constant (grâce au système tampon CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub>)
  - Milieu de culture empirique : Contient des composants indéfinis (des extraits de viande, des extraits de levures, peptones, des liquides biologiques ...): composition approximative. Ce sont des milieux très riches en substances organiques permettant une croissance aisée de nombreuses cellules.

- Milieu de culture synthétique ou défini : Milieu constitué de substances chimiques pures, sa composition qualitative et quantitative est rigoureusement connue.

### **Quel type de milieu de culture choisir?**

Il y a plusieurs types cellulaires chez les animaux et les végétaux qui diffèrent selon:

- la localisation anatomique
- l'état de différenciation
- Le choix du milieu de culture se fait en fonction du type cellulaire ou de l'expérience à réaliser

### **3. Environnement de culture :** Paramètres à respecter

- Température T= 37°
- Hygrométrie de 84 à 85 % d'humidité
- pH à 7.4 maintenu avec:
  - les tampons du milieu
  - Renforcés par l'atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> dans l'étuve d'incubation

### **4. Matériel et Instruments de culture**

- Matériel de stérilisation : Autoclaves (Chaleur + Pression), Hotte à Flux Laminaire
- Matériel de manipulation : Manipulation du matériel animal ou végétal sous conditions stériles
- Instruments de mise en culture : Micropipette Eppendorf, Boîtes de Pétri + Flacons de culture
- Matériel de mise en culture : Chambre de culture (Matériel végétal) ; Incubateur (Matériel animal)
- Matériel de lecture : Microscope photonique inversé

### **5. Contaminations :**

- **Biologique:** bactéries, virus, levures, moisissures
- **Chimique :** endotoxine, plastique, détergents, résidus
- **Croisée :** autres cellules

### **6. Précautions :**

- Se laver les mains avant après
- Port de gants et blouse
- cheveux attachés
- Nettoyage du plan de travail : (Ethanol 70%, détergent désinfectant)
- Tout ce qui est en contact avec la culture doit être stérile (flasques, pipettes, tubes...)
- Nettoyer le matériel à mettre sous la hotte

## TP Physiologie Animale : Anatomie du rat (Dissection)

### I. But

#### 1- Anatomie

- Région du cou
- Appareil digestif
- Appareil excrétoire
- Appareil génital mâle et femelle
- Appareil circulatoire

**2- Initiation :** à différentes techniques d'opérations couramment utilisées sur des animaux (rats ou lapins) objets des manipulations futures ;

- Mise en place d'une canule trachéale.
- Mise en place de canules métalliques ou de cathéters dans veines et artères pour injection intraveineuse et prélèvement de sang.

### II. Anesthésie

L'animal utilisé est un rat de laboratoire. L'anesthésie se fait par injection intrapéritonéale d'une solution de chloral ou pentobarbital.

- Chloral en solution à 10% dans du NaCl à 9‰ à raison de 3 ml/kg de rat.
- Pentobarbital en solution à 20% dans du NaCl à 9‰ à raison de 3 ml/kg de rat.

**L'animal doit rester en vie pendant toute la durée de la manipulation.**

Noter le poids de l'animal et la dose d'anesthésie injectée.

### III. Trachéotomie

Il s'agit de placer une canule dans la trachée artère afin d'éviter des accidents respiratoires possibles au cours des manipulations de longue durée sur des animaux en anesthésie profonde (l'animal risque d'avaler sa langue et de s'étouffer).

- 1- Tondre les poils du cou après les avoir mouillés.
- 2- Inciser la peau du cou en suivant une ligne médiane qui va du menton à la base du cou. On aperçoit le tissu conjonctif recouvrant les muscles du cou et les glandes salivaires.
- 3- Disséquer à la pince et non aux ciseaux le muscle sternohyoïdien qui couvre la trachée.

4- Isoler une portion de la trachée, pour placer autour d'elle une boucle de fil et préparer un nœud lâche.

Attention, faire cette opération très rapidement car la pince placée sous la trachée lui fait faire un angle et la respiration est perturbée.

5- Faire une incision aux ciseaux entre deux anneaux cartilagineux, juste sous la thyroïde dans la paroi de la trachée.

6- Après avoir nettoyé avec du coton le sang qui peut se trouver dans la plaie, introduire la canule en plastique, la pointe vers les poumons sans aller jusqu'à la division des bronches.

7- Serrer le nœud préparé à l'avance. Attacher la canule solidement.

8- Poser un tampon de coton imbibé de NaCl à 9‰ sur la plaie pour éviter la dessiccation des tissus.

#### **IV. Isolement d'un vaisseau sanguin**

##### **a. Veine jugulaire**

On canule une veine quand on veut faire des injections ou prélever des échantillons de sang veineux.

1- Repérer une des veines jugulaires (gauche ou droite) se trouvant latéralement juste sous la peau ; c'est un gros vaisseau sombre. Travailler sur la jugulaire primitive en dessous de la division jugulaire interne jugulaire externe.

2- Poser une pince hémostatique côté cœur le plus possible. Attendre que la veine se gonfle puis faire passer un fil sous le vaisseau et laisser en attente : ne pas faire de ligature.

##### **b. Carotide**

La carotide est canulée dans le but de prélever du sang artériel.

1- Rechercher la carotide du côté opposé à celui choisi par la jugulaire, elle est située profondément au voisinage de la trachée, elle est facilement identifiable par ses pulsations. Le pneumogastrique ou X lui est accolé ainsi que le nerf de Cyon.

2- La disséquer sur 2 cm environ avec des pinces en les séparant des nerfs sus-cités et passer un fil dessous pour la saisir facilement par la suite et laisser en attente.

##### **c. Anatomie (voir planche)**

- ***Système digestif***: Œsophage- Estomac- Foie et bile- Pancréas- Canal pancréato-biliaire – Duodénum- Coecum- Gros intestin- rectum
- ***Système excréteur***: Reins- Uretères- Vessie- urètres

- **Système génital :**

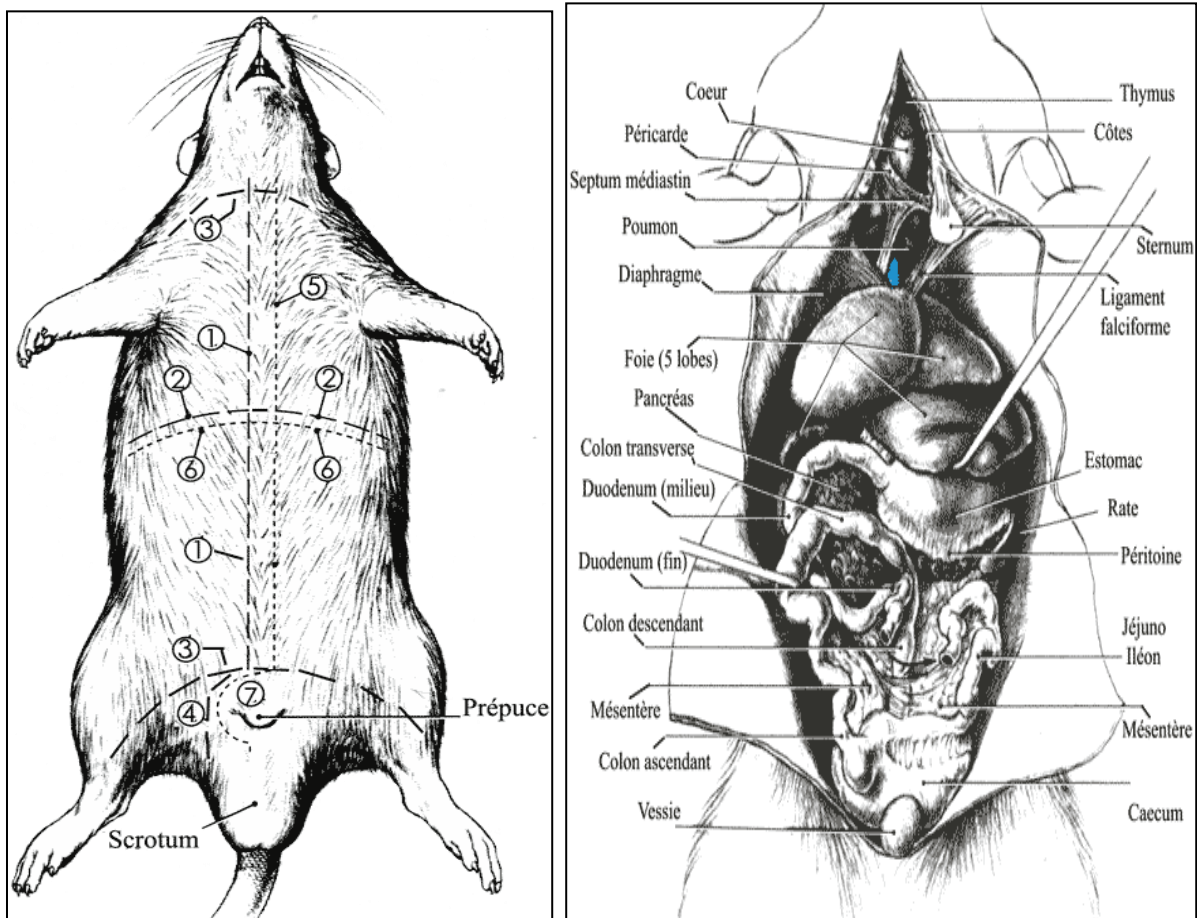
▪ **Mâle:**

- Testicules- Epididymes - Canaux déférents- Vésicules séminales- Urètres
- Glandes : prostate - glande de Cooper

▪ **Femelle:** Ovaires - Oviductes - Cornes utérines - Utérus- Col - vagin

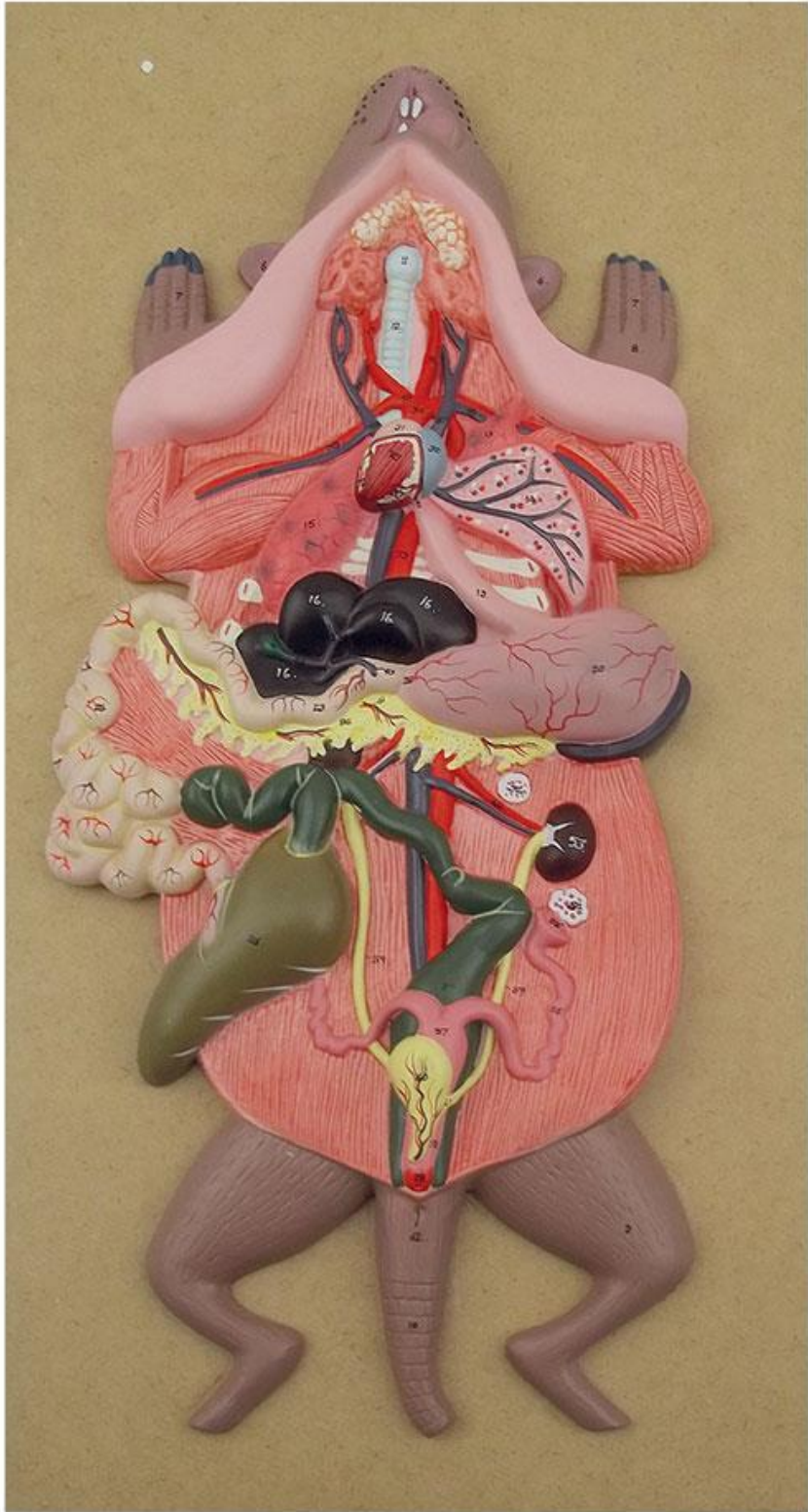
- **Système circulatoire :** Cœur- Différents vaisseaux.

**NB : A la fin de la manipulation, nettoyer tout le matériel utilise.**



**A gauche : Schéma de la coupe de la peau (grosses lignes pointillées) et des muscles du ventre et de la poitrine (petites lignes pointillées).**

**A droite : Vue ventrale des organes de la cavité abdominale et thoracique du rat.**



### ***Références bibliographiques***

- F. LACHAPELLE, GIRCOR 2002. Guide de l'évaluation éthique sur l'étude sur les animaux.
- R. RAMOUSSE 1996. Ethique et expérimentation animale. <http://www.cons-dev.org/elearning/ethic/index.html>.
- Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA). <http://www.ccac.ca/>
- **I. VEISSIER 1999.** Expérimentation animale : biologie, éthique, Réglementation. INRA Prod. Anim., Unité de recherches sur les herbivores, 12 (5), 365-375.
- **CNRS 2002.** Animalerie de laboratoire : Guide pratique pour construction et aménagement.
- **INSERM 2002.** L'expérimentation animale.
- Soins et utilisation des animaux d'expérimentation .Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation (CCPA)  
Volume 1 : [http://www.ccac.ca/fr/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GUIDES/ENGLISH/toc\\_v1.htm](http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/toc_v1.htm)  
Volume 2 :  
[http://www.ccac.ca/fr/CCAC\\_Programs/Guidelines\\_Policies/GUIDES/ENGLISH/toc\\_v2.htm](http://www.ccac.ca/fr/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/toc_v2.htm)
- **Georgia BARLOVATZ-MEIMON, Xavier RONOT 2014.** Culture de cellules animales, 3<sup>ème</sup> édition. Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-1989-1.
- **John A. Ryan.** Introduction à la culture de cellules animales. Bulletin Technique, Life sciences. [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences).