



Équipe pédagogique
Physiologie Animale et Neurosciences
Université Rennes 1, 2014

Travaux pratiques de pharmacologie

UE Pathologies cérébrales

Master 1 CAH

Substances agissant sur le système nerveux central, in vivo chez la souris

Responsable: P.BENQUET
pascal.benquet@univ-rennes1.fr

TP de pharmacologie in vivo chez la souris

Objectifs

Ce TP est une reproduction à l'identique d'un TP établi par le Pr Jean Claude DESFONTIS à l'école vétérinaire de Nantes.

Les objectifs généraux de cette séance de travaux pratiques de Pharmacologie sont les suivants:

appréhender la méthodologie employée en recherche pharmacologique : conception et limites d'un test pharmacologique, étapes de la réalisation d'une publication scientifique,
aborder de façon concrète les problèmes de l'utilisation de l'animal de laboratoire en recherche pharmacologique.

A l'issue de ces séances, chaque étudiant doit donc avoir atteint les objectifs ci-dessous énumérés.

a-Illustration du cours

Pour chacune substances utilisées, vous devez être capable:

de citer les grandes lignes de son mécanisme d'action,
de décrire et d'expliquer ses effets attendus sur le paramètre enregistré dans le test pharmacologique correspondant, en dessinant un tracé-type,
de citer des exemples d'applications thérapeutiques déroulant de ces propriétés.

b-Les tests pharmacologiques

Pour chaque test pharmacologique employé, vous devez être capable:
d'en évaluer les qualités métrologiques (Est ce que le *test* mesure bien ce qu'il est sensé mesurer ? sachant que certains des tests présentés ont été volontairement choisis imparfaits). Vous devez être **critiques**.

d'imaginer les changements éventuels à apporter afin de l'**améliorer**,
de trouver une publication scientifique dans laquelle ce test a été employé,

c-Utilisation de l'animal de laboratoire

Ces tests pharmacologiques sont réalisés sur des animaux vigiles. Leur réalisation attentive doit permettre d'acquérir les bases de l'éthique et des bonnes pratiques de l'expérimentation animale, sous le contrôle des enseignants présents, qui disposent tous d'une autorisation d'expérimentation (P. Benquet, Diplôme d'expérimentation animale Niveau I) , selon le décret n°87-848 du 19 octobre 1987. Ce TP a été validé par la préfecture d'Ille et Vilaine (autorisation 35-126) et le comité d'éthique de Rennes (dossier R-2012-PB-01).

Vous devez être capable, selon les bonnes pratiques de laboratoire :
d'effectuer la contention d'une souris,
de constituer des lots de souris et de les identifier par marquage,

Pour chaque test utilisé, vous devez être capable :
d'argumenter pour et contre son utilisation, au plan de l'éthique et, le cas échéant, de proposer une méthode alternative.

SUBSTANCES AGISSANT SUR LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Dans la phase de screening d'une molécule nouvelle, ou pour explorer plus spécifiquement l'activité centrale d'une substance psychotrope, de nombreux tests pharmacologiques peuvent être employés. Autant de facettes des comportements à explorer, autant de tests et de modèles développés, afin d'évaluer :

- l'activité globale de l'animal, qu'elle soit déprimée (tranquillisants, anesthésiques) ou augmentée (excitants, analeptiques),
- la curiosité le comportement exploratoire,
- les possibilités d'apprentissage, de conditionnement (pavlovien ou opérant),
- le tonus musculaire,
- l'équilibre ou la coordination motrice,
- l'anxiété,
- la dépression,
- etc...

Quelques-uns de ces tests, parmi des plus connus, sont mis en œuvre dans cette manipulation.

1. Substances testées

Trois substances psychotropes seront étudiées : le *diazépam*, la *caféine* et la *clomipramine*.

La caféine est un inhibiteur des phosphodiésterases, de récepteur adénosine et un agoniste de certains canaux calciques. Très liposoluble, elle est douée d'une action excitante non spécifique de l'ensemble du système nerveux central. La *caféine* n'est pratiquement pas employée en médecine vétérinaire. Chez l'homme, elle est utilisée pour limiter les effets sédatifs de certains anticonvulsivants. Elle sera testée sur les souris à la dose de **10 mg/kg**.

Le diazépam fait partie de la famille des benzodiazépines, appartenant aux tranquillisants mineurs ou anxiolytiques. Il agit comme agoniste non compétitif du GABA sur ses récepteurs GABA_A, en favorisant l'ouverture des canaux chlorures après fixation du médiateur. Il est très employé en médecine vétérinaire, comme anticonvulsivant, comme orexigène ou en pré-anesthésie. Le *diazépam* sera testé à la dose de **2,5 mg/kg**.

Clomipramine est un antidépresseur agissant par inhibition de la recapture (uptake 1) des catécholamines et de la sérotonine. Elle sera testée à la dose **10mg/kg**.

2. Tests utilisés

2.1. Test de curiosité

Une planche épaisse comportant 16 trous est placée de 50 à 70 cm du sol et dans un endroit calme. On place une souris sur cette planche, et on compte le nombre de trous qu'elles explorent

avant de lasser. La période d'enregistrement et de **5 minutes**.

2.2. Test du Rota-road

Les souris sont placées sur une tige entraînée à vitesse régulière par un moteur. Une souris témoin s'oriente sur la tige, s'adapte à la rotation et se maintient sans difficulté. On mesure le temps (en secondes) pendant lequel elle se maintient. Au-delà de **2 minutes**, le test est terminé et la souris est remise dans sa cage.

2.3. Test de la barre fixe

L'opérateur accroche délicatement les souris à un fil de fer tendu, par les "mains", puis la lâche. Une souris témoin effectue un rétablissement et se retrouve au-dessus du fil en s'aidant de ses membres postérieurs et de sa queue. Sous l'effet d'un hypnotique, elle tombe immédiatement. Sous l'effet d'un neuroleptique, elle reste accrochée sans réagir (catatonie). On mesure le temps nécessaire au rétablissement (les différences ne sont pas comptabilisées quand les souris mettent moins de deux secondes). Au-delà de **30 secondes** le test est terminé et la souris est remise dans sa cage.

2.4 Test de motilité (optionnel)

L'opérateur place la souris au centre du cercle situé au milieu d'autres cercles concentriques. Tout déplacement de la souris sera quantifié un attribuant 1 point à chaque passage d'un cercle à un autre. La période totale d'enregistrement est de 5 min.

3. Manipulation

3.1 Constitution des lots

Former, par tirage au sort, les lots de souris, et les marquer individuellement :

- ◁ Lot Contrôle : marqué d'un trait sur la queue
- Lot Caf : marqué d'un point sur le dessus de la tête,
- Lot Clo : marqué d'un point sur la nuque,
- Lot Dia : marqué d'un point au milieu du dos,

Au sein de chaque lot, les souris sont reconnues par une marque à la base de chaque membre.

Peser individuellement les souris et noter leur poids.

3.2. Injection des substances

Au moment opportun, toutes les substances sont injectées par voie sous-cutanée par l'enseignant. Les dilutions ont été réalisées de façon à ce que, quelle que soit la dose à administrer, le volume injecté soit le même pour les animaux : 0,2/20g.

Le plus **grand soin doit être mis** dans la **contention** des souris et l'injection des substances. Le lieu d'injection doit être le même pour tous les animaux, et l'intégralité du volume à injecter doit être administré.

Le stress de contention subi par les animaux doit être le même pour tous. Aucun animal ne doit avoir été contenu plus longtemps que les autres. Il est recommandé de s'entraîner à la contention avant de commencer les manipulations. Des souris surnuméraires sont prévues à cet effet.

3.3. Déroulement des opérations

Prenez du temps pour bien **réfléchir à votre protocole**. *Vous pouvez le mettre au point avant d'arriver en TP.*

Constitution des lots, nombre d'animaux, manipulations, temps d'expérimentation, environnement de la souris, stress, biais, qualité des expériences contrôle.

Les tests doivent s'enchaîner de façon coordonnée, et le temps entre l'injection d'une substance et le test effectué doit être le même pour tous les animaux.

Test statistiques :

Exemple de Test non paramétrique :

test non paramétrique de Friedman pour la comparaison de k échantillons

puis Comparaison 2 à 2 avec Mann–Whitney–Wilcoxon

enfin un Test de Bonferroni : ce test post-hoc peut être utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance

Remarques :

En analysant les tests, et en s'appuyant le cas échéant sur les difficultés rencontrées, réfléchir aux points suivants :

- *Les tests de curiosités, du rota-road et de la barre fixe auraient-ils dû être réalisés en cross-over?*
- *Pour chaque test, comment doit-on calculer les paramètres et présenter les résultats?*
- *Que dire des qualités métrologiques de ces tests? Quels biais pourraient être à l'origine d'erreurs par excès ou par défaut, ou d'un manque de reproductibilité?*
 - *Quelles améliorations éventuelles pourrait-on y apporter?*