



LABORATOIRE DE PHARMACOLOGIE
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

TRAVAUX PRATIQUES DE PHARMACOLOGIE

4^{ème} ANNEE DE PHARMACIE

année 2007-2008

Enseignants intervenants :

M^{me} P. DEMICHEL

M. P. DUFOUR

M^{lle} V. LEBLAIS

M. F. POURAGEAUD

M. C. TOUSSAINT

Une partie des équipements pédagogiques utilisés dans ces séances de travaux pratiques
a été financée par une subvention

Conseil Régional d'Aquitaine – Université Victor Segalen.



SOMMAIRE

Les étudiants sont priés de lire "l'avant-propos et les règles générales" avant la 1^{ère} séance de Travaux Pratiques.

page

AVANT-PROPOS ET REGLES GENERALES-----4

- I - Objectifs pédagogiques des travaux pratiques
- II - Règles générales et organisation des travaux pratiques

Séance 1 : PHARMACOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL :

Effet de substances pharmacologiques sur les fonctions d'apprentissage et de mémoire chez l'animal - Modèle du "Water Maze" par E.A.O. (Enseignement Assisté par Ordinateur) ----- 7

- I - Appareillage
- II - Animaux
- III - Expérimentation
- IV – Analyse et interprétation des résultats

Séance 2 : PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE :

Etude de différentes familles de médicaments antihypertenseurs chez l'animal "in vivo" par E.A.O. (Enseignement Assisté par Ordinateur) ----- 10

- I - Explications générales sur le logiciel de stimulation en pharmacologie cardiovasculaire
- II - Action de différentes substances hypertensives
- III - Etude d'un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques
- IV - Etude d'un antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques
- V - Etude d'un inhibiteur d'influx calcique
- VI - Etude des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques
 - VI- 1- Caractérisation des β -bloquants
 - VI- 2- Effets de l'angiotensine II en présence de β -bloquants
- VII – Analyse des résultats et conclusion

Séance 3 : Travaux Pratiques Intégrés :

PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE :

Evaluation des effets pharmacologiques du propranolol sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle chez l'animal anesthésié--- 20

- I - Objectifs
- II - Préparation de l'animal pour l'enregistrement de la pression artérielle
 - II-1- Matériel expérimental
 - II-2- Mode opératoire
- III - Protocole expérimental
- IV – Compte-rendu

Séance 4 : Travaux Pratiques Intégrés :

PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE :

Evaluation des effets pharmacologiques de la nifédipine sur une préparation artérielle isolée----- 31

- I – Introduction et objectifs
- II – Matériels et méthodes
- III - Protocole expérimental
 - III-a- Principe général
 - III-b- Calculs et préparation des dilutions des substances pharmacologiques
 - III-c- Effets de la nifédipine sur la contraction à la phényléphrine
 - III-d Effets de la nifédipine sur la contraction induite par la solution dépolarisante
- IV – Compte-rendu

AVANT-PROPOS ET REGLES GENERALES

I- OBJECTIFS PEDAGOGIQUES DES TRAVAUX PRATIQUES

Les Travaux Pratiques de 4^{ème} année apportent une illustration concrète à l'enseignement théorique, en particulier aux enseignements Coordonnés du **Système Nerveux Central** et du **Système Cardiovasculaire**. L'étudiant pourra ainsi consulter ses notes de cours lors des séances de TP. Ces séances illustrent, essentiellement sur des **modèles *in vivo***, l'effet de diverses molécules, utilisées pour la plupart en thérapeutique.

Ces travaux pratiques doivent permettre à l'étudiant :

- de transposer les notions théoriques exposées en cours à un effet donné, sur un modèle donné ;
- d'analyser les effets de diverses molécules et ainsi de caractériser les récepteurs ou les médiateurs impliqués dans une réponse donnée ;
- d'interpréter les résultats expérimentaux obtenus en fonction des connaissances acquises ;
- de présenter les expériences réalisées sous forme d'un compte-rendu écrit.

Au cours de ces Travaux Pratiques, les expériences sont réalisées par les étudiants sur des modèles *in vivo* et *in vitro* (organes isolés), soit réels, soit simulés sur ordinateur. La mise en place de certains de ces outils a été possible grâce à des co-financements "Conseil Régional d'Aquitaine / Université Bordeaux 2".

II- REGLES GENERALES ET ORGANISATION DES TRAVAUX PRATIQUES

II-1- Assiduité aux séances de Travaux Pratiques

- **La présence** aux Travaux Pratiques **est obligatoire** (cf. « Modalités du contrôle des connaissances durant les études pharmaceutiques - Année universitaire 2007-2008 »).
- En cas d'impossibilité d'assister à une séance, l'étudiant est prié de **prendre contact dans les 48h** avec un enseignant des Travaux Pratiques afin de justifier son absence et de convenir des modalités de rattrapage de la séance (N° Tél. du laboratoire : 05 57 57 12 11). Au-delà de 48h, l'absence sera considérée comme non justifiée.
- **Toute absence non justifiée sera sanctionnée d'une note de 0/20 à la séance et conduira à l'invalidation des Travaux Pratiques.**

II-2- Cas des doublants et triplants

(cf. « Modalités du contrôle des connaissances durant les études pharmaceutiques - Année universitaire 2007-2008 »).

- Les *doublants* doivent obligatoirement **prendre contact avec le responsable** des Travaux Pratiques. Si la note de Travaux Pratiques de l'année précédente est supérieure ou égale à 10, l'étudiant peut conserver cette note. Si la note de Travaux Pratiques de l'année précédente est inférieure à 10, l'étudiant doit obligatoirement assister et valider cette année les Travaux Pratiques.
- Les *triplants* (et +) doivent à nouveau assister et **valider les Travaux Pratiques**, quelles que soient leurs notes précédentes.

II-3- Déroulement des séances de Travaux Pratiques

- Les étudiants devront obligatoirement porter une **blouse blanche**.
- Il est souhaité que les étudiants se munissent d'un **badge** indiquant leurs prénom et nom.
- Il est également demandé à chaque étudiant de disposer d'un **cahier destiné aux Travaux Pratiques**. Au cours de la séance, l'étudiant devra y **consigner toutes ses observations** : calculs de dilutions, procédures expérimentales, données brutes, commentaires divers ...
- Les étudiants doivent **préparer** leurs séances de Travaux Pratiques. L'ordre de déroulement des séances sera communiqué à l'étudiant lors du 1^{er} jour de Travaux Pratiques.
- A tout moment de la séance de Travaux Pratiques, l'enseignant aura la possibilité de poser une interrogation portant sur l'objectif de la manipulation, son principe, la méthodologie appliquée... La note obtenue par chaque étudiant à cette **interrogation ponctuelle** sera intégrée à la notation finale en tant que contrôle continu.
- Les étudiants devront, avant de partir, laisser leur **paillasse propre** ainsi que le matériel utilisé lors de la séance.
- Certaines séances de pharmacologie se font sur du matériel vivant dont les réponses peuvent être modifiées en fonction de l'environnement. Aussi, il est important que les séances de travaux pratiques se déroulent dans le calme et tout en **respectant le matériel vivant**.

II-4- Notation des séances de Travaux Pratiques

La notation de la séance de Travaux Pratiques (note /20) tiendra compte des notes :

- du **compte-rendu écrit** : la rédaction d'un compte-rendu écrit sera faite par binôme (voire trinôme) à chaque séance. Le contenu de celui-ci sera détaillé lors de la séance. Selon les séances, celui-ci devra soit être rédigé à la fin de la séance et laissé sur place, soit rendu à l'enseignant dans un délai fixé par celui-ci.

et - du **contrôle continu** : celui-ci tiendra compte de l'éventuelle **interrogation ponctuelle** le jour de la séance ainsi que de **la participation et de l'application de l'étudiant lors du TP**. Ainsi chaque étudiant sera noté individuellement en fonction de son implication.

La note obtenue aux séances de Travaux Pratiques Intégrés sera intégrée à la note globale de l'Enseignement Intégré « La chaîne du médicament ».

Tout étudiant absent (sans excuse valable; cf. paragraphe II-1) ou partant avant la fin de la séance sera **sanctionné par une note de 0/20**.

PHARMACOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Effet de substances pharmacologiques sur les fonctions d'apprentissage et de mémoire chez l'animal "*in vivo*"

Modèle du "Water Maze" par E.A.O. (Enseignement Assisté par Ordinateur)

INTRODUCTION

Ce modèle "Water Maze" (bac aquatique) est utilisé pour évaluer les **fonctions d'apprentissage et de mémoire** chez l'animal et leurs modifications par différentes substances pharmacologiques.

I- APPAREILLAGE

Il est constitué d'un bac contenant du liquide coloré et d'une plate-forme immergée dans ce liquide opaque. Le dispositif est relié à un ordinateur qui enregistre trois paramètres :

- le temps de latence : temps que met l'animal pour trouver la plate-forme, exprimé en secondes ;
- la longueur parcourue par l'animal avant de trouver la plate-forme, exprimée en centimètres ;
- la vitesse de nage de l'animal, exprimée en cm / sec.

L'animal ne peut pas voir la plate-forme puisque le liquide est opaque ; il trouvera la plate-forme par hasard.

Le test est réalisé sur 4 jours, le 1^{er} jour l'animal trouve la plate-forme par hasard et les jours suivants, l'animal fait appel à ses qualités d'apprentissage et de mémoire.

II- ANIMAUX

Il s'agit de rats qui sont groupés par lots de 6.

III- EXPERIMENTATION

- Sur l'écran de votre ordinateur, choisir la rubrique « THE WATER MAZE » puis « INTRODUCE APPARATUS » : l'appareillage vous est décrit.
- Choisir ensuite « WATER MAZE MENU » puis « EXPLAIN DATA ANALYSIS » : l'analyse des données vous est expliquée selon 6 items.
- Revenir sur « WATER MAZE MENU » et « GET UN NEW PROBLEM » : un problème vous est posé. Lire et noter la question posée. Vous répondrez à cette question à la fin de l'expérimentation.

Appuyer sur la souris, sur votre écran s'affiche une série d'expériences à réaliser.

1° réaliser le test avec le lot d'animaux non traités sur 4 jours (**lot témoin** : « untreated rats »). Les trois paramètres latence, longueur et vitesse sont enregistrés pour chaque animal témoin pendant 4 jours. Noter les résultats obtenus.

2° réaliser le test avec un **antagoniste cholinergique**.

Noter les résultats comme précédemment.

3° réaliser le test avec un **inhibiteur des cholinestérases** qui franchit la barrière hémato-encéphalique.

Noter les résultats comme précédemment.

4° réaliser le test avec les associations : - **physostigmine + scopolamine**
et - **néostigmine + scopolamine**

Noter les résultats comme précédemment.

5° réaliser le test avec la **substance X** pour répondre à la question posée au début de l'expérimentation.

Noter les résultats comme précédemment.

IV- ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

1° Reporter tous les résultats dans un fichier Excel.

Faire la moyenne de chaque paramètre par jour et par lot.

Etablir un graphique représentant en abscisse, les jours du test et en ordonnée, la valeur du paramètre considéré (latence, longueur ou vitesse).

2° D'après les résultats obtenus, quelle conclusion pouvez-vous faire sur l'action positive ou négative des substances étudiées dans ce modèle en ce qui concerne le temps de latence, et les performances motrices ?

Que pouvez-vous répondre à la question posée concernant la substance X ? Justifiez votre réponse.

PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE

Etude de différentes familles de médicaments antihypertenseurs chez l'animal "*in vivo*"

par E.A.O. (Enseignement Assisté par Ordinateur)

I- EXPLICATIONS GENERALES SUR LE LOGICIEL DE STIMULATION EN PHARMACOLOGIE CARDIOVASCULAIRE

- Lire l'introduction présentant l'approche expérimentale. Afficher les différents écrans après lecture en sélectionnant « click to continue ».

- Sur l'écran apparaît le choix entre deux types de doses à injecter :

- en unité de masse (tel que mg/kg)
- en unité molaire (tel que nmoles/kg)

Vous travaillerez avec des **doses en mg/kg**.

- Ensuite apparaît sur l'écran trois choix de préparation animale *in vivo* :

- 1- Si vous désirez un animal sans aucun traitement (« normal anaesthetised animal »). Dans ce cas, les réponses obtenues seront le résultat des effets propres de la substance pharmacologique étudiée mais aussi des phénomènes réflexes.

- 2- Si vous désirez un animal ayant été traité par la réserpine (1mg/kg, 24 et 48 heures avant l'expérimentation).

N.B. La réserpine est un inhibiteur du transporteur membranaire des monoamines (VMAT). Elle va provoquer la déplétion des catécholamines de leurs granules de stockage situés dans la fibre post-ganglionnaire au niveau pré-synaptique. De ce fait, les animaux présentent une pression artérielle et un rythme cardiaque faibles (chute du tonus sympathique) mais ils conservent la possibilité de répondre à des substances pharmacologiques injectées par voie générale qui agissent sur les récepteurs post-synaptiques. En revanche, ces animaux ne répondent plus à une stimulation des nerfs sympathiques.

- 3- Si vous désirez travailler sur un animal déméduillé (« pithed animal »).

N.B. Un animal déméduillé est un animal dont on a détruit la moelle épinière supprimant ainsi les connexions entre le SNC et le SNA. Ce type de préparation qui équivaut à une préparation isolée sur animal entier "*in vivo*" permet d'étudier les effets périphériques des substances en excluant l'intervention du SNC et les phénomènes réflexes.

Liste des molécules disponibles

Molécules	Propriété pharmacologique / action principale	Molécules	Propriété pharmacologique / action principale
<i>Acétylcholine</i>	neuromédiateur du système parasympathique, agoniste endogène des R. cholinergiques	<i>Néostigmine</i>	inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase
<i>Adrénaline</i>	médiateur du système sympathique, agoniste endogène des R. adrénergiques	<i>Nifédipine</i>	bloqueur des canaux Ca^{2+} de type L ($Ca_v1.2$)
<i>Angiotensine II</i>	agoniste endogène des R. à l'angiotensine II	<i>Noradrénaline (NA)</i>	neuromédiateur du système sympathique, agoniste endogène des R. adrénergiques
<i>Apexole (BHT 920)</i>	agoniste des R. α_2 -adrénergiques	<i>Phénoxybenzamine</i>	antagoniste des R. α -adrénergiques (irréversible)
<i>Aténolol</i>	antagoniste du R. β_1 -adrénergique	<i>Phényléphrine</i>	agoniste des R. α_1 -adrénergiques
<i>Atropine</i>	antagoniste des R. muscariniques	<i>Prazosine</i>	antagoniste des R. α_1 -adrénergiques
<i>Cocaïne</i>	inhibiteur des transporteurs neuronaux des monoamines	<i>Propranolol</i>	antagoniste des R. β_1 - et β_2 -adrénergiques
<i>Diméthylphényl-pipérazinium</i>	agoniste des R. nicotiques neuronaux (<i>stimulant ganglionnaire</i>)	<i>Ranitidine</i>	antagoniste des R. H_2
<i>Guanéthidine</i>	inhibiteur du potentiel d'action des fibres sympathiques postganglionnaires	<i>Sérum physiologique</i>	
<i>Hexamethonium</i>	antagoniste des récepteurs nicotiques neuronaux (<i>ganglioplégique</i>)	<i>Tyramine</i>	substrat du transporteur neuronal de la NA (<i>sympathomimétique indirect</i>)
<i>Histamine</i>	agoniste endogène des R. à l'histamine	<i>Vasopressine</i>	hormone antidiurétique
<i>Isoprénaline</i>	agoniste des R. β -adrénergiques	<i>Yohimbine</i>	antagoniste des R. α_2 -adrénergiques
<i>Mépyramine</i>	antagoniste des R. H_1		

II- ACTION DE DIFFERENTES SUBSTANCES HYPERTENSIVES

Choisir un **animal sans prétraitement**.

Sur l'écran, vous avez d'une part, l'enregistrement de la pression artérielle (*en rouge*) en mm Hg (échelle sur la droite) et, d'autre part, l'enregistrement du rythme cardiaque (*en bleu*) exprimé en battements/min (échelle sur la gauche). Cliquer sur « select drug or other procedure ». Il apparaît alors sur l'écran une liste de substances à administrer, à gauche de l'écran, et une liste de stimulations nerveuses, à droite de l'écran.

① Sélectionner le **médiateur du système noradrénergique** et l'injecter à la dose de **1 µg/kg** (déterminer la dose en cliquant dans la « digit box » puis préciser l'unité).

Répéter cette procédure avec **5 et 10 µg/kg**. Vous devez sélectionner chaque fois la substance avant d'entrer la dose que vous allez injecter. Entre chaque dose injectée, l'écran vous présente l'effet produit par la dose injectée.

Observer l'action de cette substance sur la pression artérielle et le rythme cardiaque en fonction des doses injectées.

Remarque : Il est possible de balayer l'enregistrement en remontant dans le temps grâce aux flèches situées en bas de l'écran. Pour imprimer, appuyer sur la touche « Impr écran ».

② Choisir sur la liste un **agoniste des récepteurs α₁-adrénergiques**.

Recommencer la même opération qu'avec le neuromédiateur du système noradrénergique et avec les mêmes doses.

Observer l'action de cette substance sur la pression artérielle et le rythme cardiaque en fonction des doses injectées.

③ **Action de l'angiotensine II sur la pression artérielle et le rythme cardiaque**

Administrer l'angiotensine II aux doses de 1, 5 et 10 µg/kg.

Décrire les effets de l'angiotensine II sur la pression artérielle et le rythme cardiaque.

④ Choisir sur la liste présentée un **agoniste des récepteurs α₂-adrénergiques**.

Administrer cette substance aux doses de 10, 50 et 100 µg/kg.

⑤ **Répéter ce dernier protocole expérimental chez un animal démédullé**. Pour obtenir un tel animal, cliquer sur « select drug or other procedure », puis « terminate preparation », puis

« continue this experiment on another preparation ». Sélectionner l'animal souhaité puis administrer à l'animal l'agoniste α_2 -adrénergique aux mêmes doses que précédemment.

Décrire les effets de cet agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques sur la pression artérielle et le rythme cardiaque. Comparer ces effets à ceux obtenus avec le neuromédiateur du système noradrénergique et de l'agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques. Expliquer les différences éventuelles ainsi que l'intérêt de travailler chez un animal démyélinisé.

III- ETUDE D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS α_1 -ADRENERGIQUES

① Reprendre un autre animal : cliquer sur « select drug or other procedure », puis « terminate preparation », puis « continue this experiment on another preparation ».

Continuer à travailler sur un animal sans prétraitement.

- Injecter un agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques à la dose de 10 $\mu\text{g/kg}$
 - Injecter l'angiotensine II à la dose de 10 $\mu\text{g/kg}$
 - Injecter un agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques à la dose de 50 $\mu\text{g/kg}$
- } contrôles

Ces injections constituent les effets contrôles de ces 3 agents pharmacologiques.

② Reprendre un autre animal. Injecter ensuite **un antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques à la dose de 100 $\mu\text{g/kg}$** puis injecter de nouveau l'agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, l'angiotensine II et l'agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques aux mêmes doses que précédemment, dans les conditions contrôles.

Comparer l'action de ces différentes substances en l'absence et en présence de l'antagoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques.

IV- ETUDE D'UN ANTAGONISTE DES RECEPTEURS α_2 -ADRENERGIQUES

Reprendre un autre animal.

Pré-traiter l'animal avec un **antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques à la dose de 100 $\mu\text{g/kg}$** puis injecter de nouveau l'agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, l'angiotensine II et l'agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques aux mêmes doses que dans les conditions contrôles.

Comparer l'action de ces trois substances en l'absence et en présence de l'antagoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques.

V- ETUDE D'UN INHIBITEUR D'INFLUX CALCIQUE

Reprendre un autre animal. Continuer à travailler sur un animal sans prétraitement.

Injecter ensuite **l'inhibiteur d'influx calcique à la dose de 200 µg/kg**.

Injecter de nouveau les substances témoins aux mêmes doses que précédemment.

Observer l'action de l'inhibiteur d'influx calcique injecté et noter les variations éventuelles de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.

Comparer l'action de l'agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques, l'angiotensine II et l'agoniste des récepteurs α_2 -adrénergiques en l'absence et en présence de l'inhibiteur d'influx calcique.

VI- ETUDE DES ANTAGONISTES DES RECEPTEURS β -ADRENERGIQUES

VI- 1- Caractérisation des β -bloquants

① Choisir un animal sans prétraitement. Injecter de **l'isoprénaline à la dose de 1 µg/kg**.

Décrire ses effets sur la pression artérielle et le rythme cardiaque et expliquer les mécanismes d'action mis en jeu.

Injecter du **propranolol à la dose de 100 µg/kg**. Puis injecter de nouveau l'isoprénaline à la même dose que précédemment.

Observer les effets du propranolol sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque de repos ainsi que sur les variations de ces deux paramètres induites par l'isoprénaline.

② Reprendre un autre animal sans prétraitement. Injecter de l'isoprénaline à la dose de 1 µg/kg. Puis injecter de **l'aténolol à la dose de 100 µg/kg** et injecter de nouveau l'isoprénaline à la même dose que précédemment.

Commenter les effets de l'aténolol. Comparer les effets de l'isoprénaline en l'absence et en présence d'aténolol.

③ Reprendre un autre animal sans prétraitement. Recommencer le même protocole que ci-dessus mais en injectant une dose d'**aténolol** supérieure : **400 µg/kg**.

Comparer les effets de l'aténolol en fonction de la dose administrée. Commenter vos résultats.

VI- 2- Effets de l'angiotensine II en présence de β -bloquants

Travailler sur des animaux sans prétraitement. Etudier l'effet de l'angiotensine II à la dose de 10 $\mu\text{g/kg}$, en l'absence et en présence de propranolol (100 $\mu\text{g/kg}$) ou d'aténolol (100 $\mu\text{g/kg}$).

Commenter.

VII- ANALYSE DES RESULTATS et CONCLUSION

Reporter dans un tableau (cf. p16, 17 et 18) les tracés représentatifs de fréquence cardiaque et de pression artérielle (*variations qualitatives*) observés dans chaque condition expérimentale.

Décrire les effets de chaque substance étudiée sur les paramètres mesurés. Expliquer le mécanisme d'action de ses substances (notamment, le type et la localisation des récepteurs impliqués) en vous basant sur vos connaissances ainsi que sur les expériences réalisées.

Sur le schéma ci-joint (p19), indiquer les cibles pharmacologiques et le mécanisme d'action des molécules étudiées.

Parmi les molécules étudiées, quelles sont celles ayant des propriétés anti-hypertensives ? Indiquer les propriétés communes et les différences de ces classes pharmacologiques.

Tracés contrôles de fréquence cardiaque			
	Dose 1	Dose 2	Dose 3
Neuromédiateur sympathique			
Agoniste des R. α_1 -adrénergiques			
Angiotensine II			
Agoniste des R. α_2 -adrénergique			

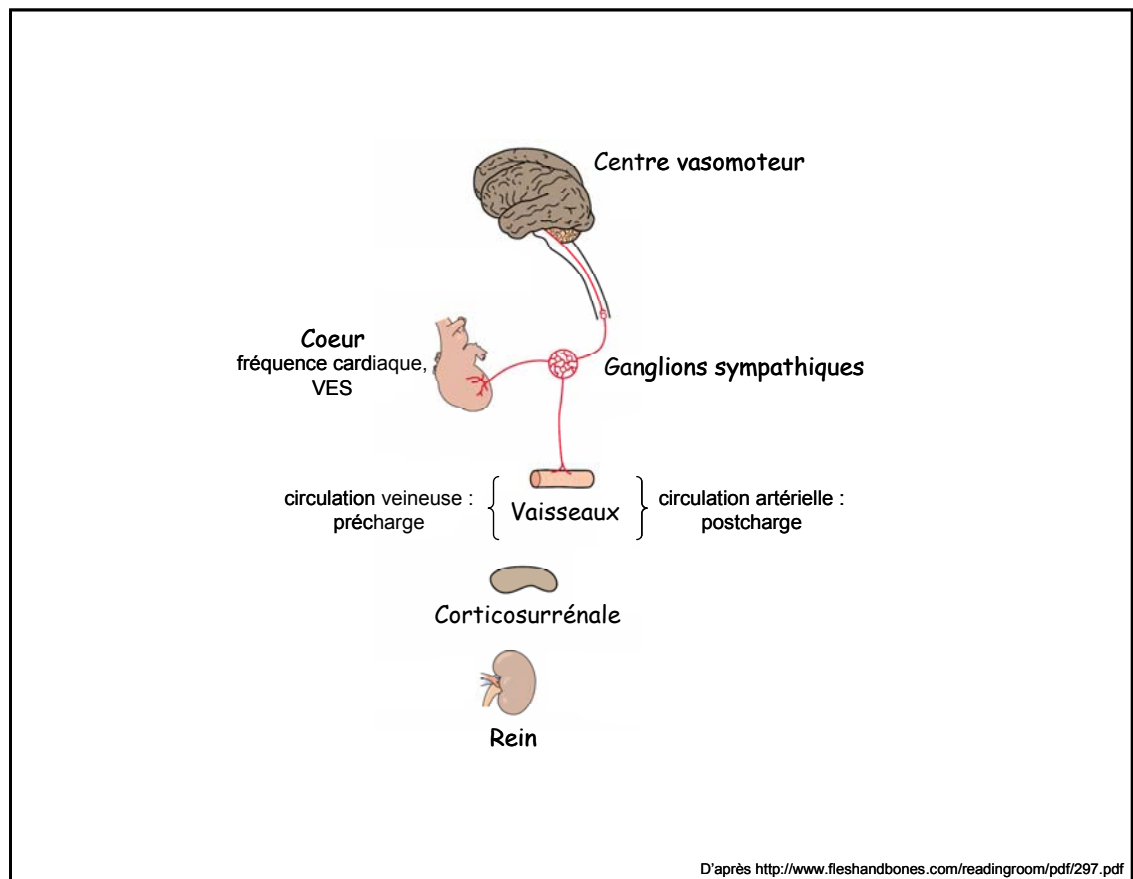
Tracés contrôles de pression artérielle			
	Dose 1	Dose 2	Dose 3
Neuromédiateur sympathique			
Agoniste des R. α_1 -adrénergiques			
Angiotensine II			
Agoniste des R. α_2 -adrénergique			

Tracés de fréquence cardiaque				
	Contrôle	+ antagoniste α_1-adrénergique	+ antagoniste α_2-adrénergique	+ inhibiteur influx calcique
Agoniste des R. α_1 -adrénergiques (10 μ g/kg)				
Angiotensine II (10 μ g/kg)				
Agoniste des R. α_2 -adrénergiques (50 μ g/kg)				
Agoniste des R. α_2 -adrénergiques <i>chez animal démédullé</i>				

Tracés de pression artérielle				
	Contrôle	+ antagoniste α_1-adrénergique	+ antagoniste α_2-adrénergique	+ inhibiteur influx calcique
Agoniste des R. α_1 -adrénergiques (10 μ g/kg)				
Angiotensine II (10 μ g/kg)				
Agoniste des R. α_2 -adrénergiques (50 μ g/kg)				
Agoniste des R. α_2 -adrénergiques <i>chez animal démédullé</i>				

Tracés de fréquence cardiaque				
	Contrôle	+ propranolol 100 µg/kg	+ aténolol 100 µg/kg	+ aténolol 400 µg/kg
Isoprénaline (1 µg/kg)				
Angiotensine II (10 µg/kg)				

Tracés de pression artérielle				
	Contrôle	+ propranolol 100 µg/kg	+ aténolol 100 µg/kg	+ aténolol 400 µg/kg
Isoprénaline (1 µg/kg)				
Angiotensine II (10 µg/kg)				

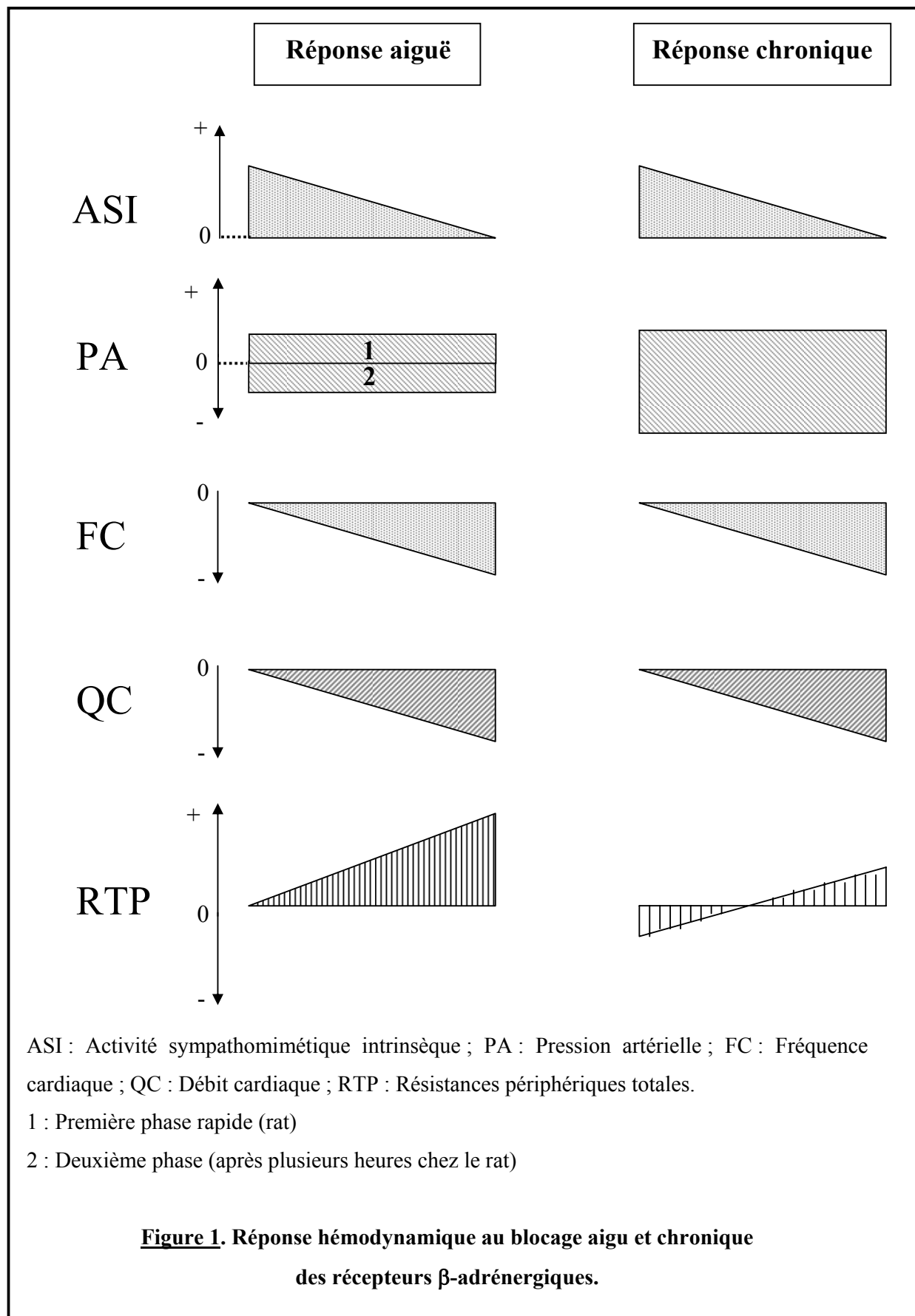


PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE**Travaux Pratiques Intégrés :****Evaluation des effets pharmacologiques du propranolol sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle chez l'animal anesthésié****I- OBJECTIFS**

Les effets du **propranolol**, antagoniste **non sélectif des récepteurs β -adrénergiques**, seront évalués chez le rat anesthésié sur les paramètres hémodynamiques suivants :

- Pression artérielle systolique (PAS, mmHg) et diastolique (PAD, mmHg) qui correspondent à la pression maximale et minimale, respectivement.
- Pression artérielle moyenne (PAM, mm Hg) qui ne correspond pas à une moyenne arithmétique de la PAS et PAD, car le sang circulant dans les artères reste plus longtemps proche des valeurs diastoliques que systoliques. Par conséquent, la pression moyenne se calcule à partir de la relation suivante :
$$PAM = PAD + (PAS - PAD)/3$$
- Fréquence cardiaque (FC, battements/min) qui dépend directement de l'activité du nœud sinusal situé dans l'oreillette droite.

Les effets hémodynamiques des antagonistes des récepteurs β -adrénergiques sont différents selon qu'ils sont étudiés en **aigu** ou en **chronique**. D'autre part, la présence d'une **activité sympathomimétique intrinsèque** (ASI) d'un β -bloquant modifie certains paramètres hémodynamiques quelle que soit la condition d'étude (aiguë et chronique). Ces différents effets peuvent être alors résumés sur le schéma de la figure 1 de la page suivante.



II- PREPARATION DE L'ANIMAL POUR L'ENREGISTREMENT DE LA PRESSION ARTERIELLE

II-1- Matériel expérimental:

- Rat mâle de 300-500 g * ;
- Instruments de dissection ;
- Cathéter polyéthylène pour la carotide ;
- Canule longue pour la veine du pénis ;
- Planche, fils, cordelette ;
- Canule à trachée, clamp artériel ;
- Coton ;
- Sérum physiologique et sérum physiologique hépariné (50 UI/ml).

* Le laboratoire de Pharmacologie de l'UFR de Pharmacie est un établissement agréé pour l'expérimentation animale (agrément n° A33049, délivré par la Préfecture de Gironde).

II-2- Mode opératoire :

- L'animal est anesthésié à l'uréthane (1g/kg) par voie intra péritonéale (IP) avant le début de la séance de TP par les enseignants.
- Le rat est couché sur le dos et ligaturé en extension par les 4 membres.
- Immobiliser la tête par l'intermédiaire des incisives supérieures, laisser libre le maxillaire inférieur.

II-2-1 Trachéotomie

- Inciser la peau du cou sur 2 à 3 cm suivant la ligne médiane en partant de 1 cm en dessous de la mâchoire. L'incision comprendra la peau et le muscle peaucier. Il apparaît alors les muscles sterno-maxillaire et sterno-thyroïdien.
- Ecarter **à l'aide des pinces** les masses musculaires en suivant la même direction que l'incision de la peau (voir schéma du haut de la figure 2).
- Isoler la trachée des tissus environnants et passer un fil en dessous.
- Faire une demi-section entre deux anneaux cartilagineux et introduire la canule (vers les poumons) puis ligaturer solidement.

II-2-2 Canulation de la carotide

- Repérer de chaque côté de la trachée, à un niveau plus profond le paquet vasculo-nerveux qui comprend l'artère carotidienne (facilement repérable grâce à sa couleur rouge et à ses battements) et 3 nerfs. Le plus gros est le nerf pneumogastrique, les deux autres sont le nerf du Cyn et le nerf sympathique cervical.
- A l'aide de pinces, isoler la carotide gauche du conjonctif et des nerfs qui l'accompagnent sur deux centimètres (voir schéma du bas de la figure 2).
- Passer deux fils sous la carotide, l'un du côté céphalique, l'autre du côté cardiaque.
- Ligaturer, le plus haut possible, l'artère du côté céphalique (pour empêcher les hémorragies récurrentes).
- Clamper à l'aide de la pince hémostatique (clamp) la carotide le plus bas possible vers le cœur et au-delà du fil placé du côté cardiaque.
- Soulever la carotide avec des pinces, puis faire une demi-section (en bec de flûte) de celle-ci, assez haut du côté de la ligature céphalique à l'aide de ciseaux fins, tenus obliquement, la pointe dirigée vers le cœur.
- Introduire dans l'ouverture pratiquée, en le dirigeant vers le cœur le cathéter polyéthylène préalablement rempli de sérum physiologique hépariné.
- Lier la paroi de l'artère sur la canule avec le fil proximal (le plus proche du cœur).

II-2-3 Isolement et canulation de la veine du pénis :

La veine du pénis se trouve sur la partie supérieure de celui-ci (voir la figure 3).

- A l'aide d'une pince, tirer légèrement sur le pénis que l'on tient avec la main gauche.
- Dégager la peau superficielle qui recouvre celui-ci.
- Repérer et isoler du mieux possible la veine qui longe le pénis.
- Passer un fil sous la veine.
- Effectuer une demi-section (en bec de flûte), au milieu de la portion de veine dégagée, à l'aide de ciseaux fins tenus obliquement, la pointe dirigée vers l'animal.
- Introduire dans l'ouverture pratiquée la canule vers l'animal et ligaturer fortement avec le fil proximal.
- Vérifier que la canule est bien dans la veine en injectant du sérum physiologique avec une seringue. Le sérum doit alors s'écouler sans résistance dans la veine.

Les substances pharmacologiques à étudier seront administrées par cette voie intraveineuse.

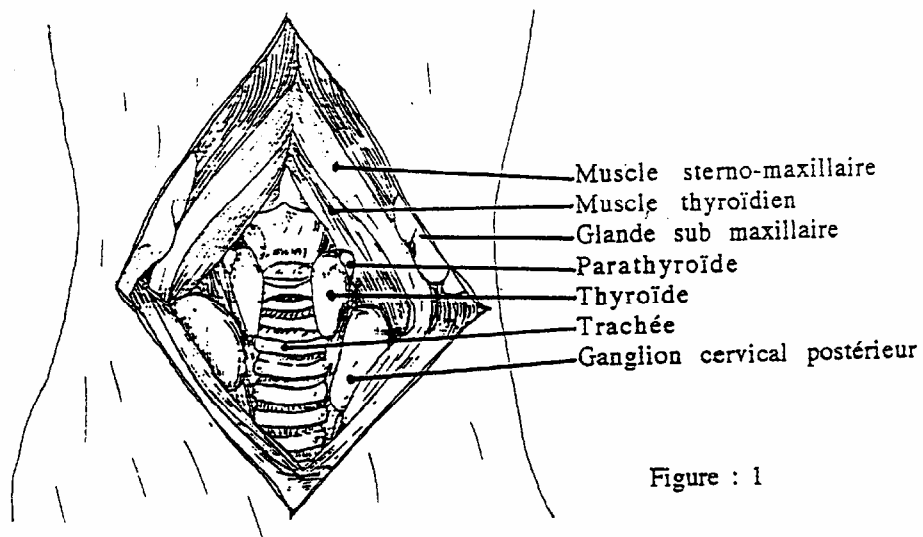


Figure : 1

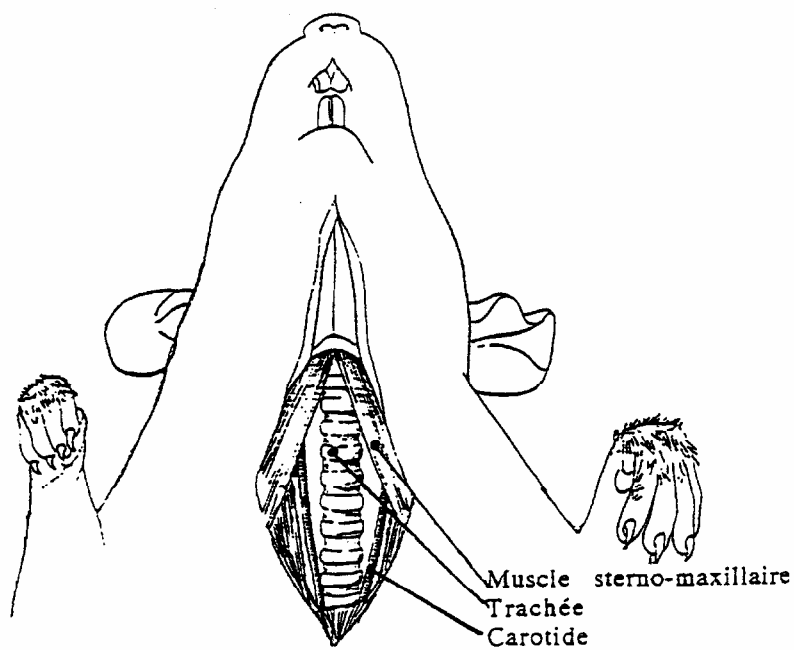
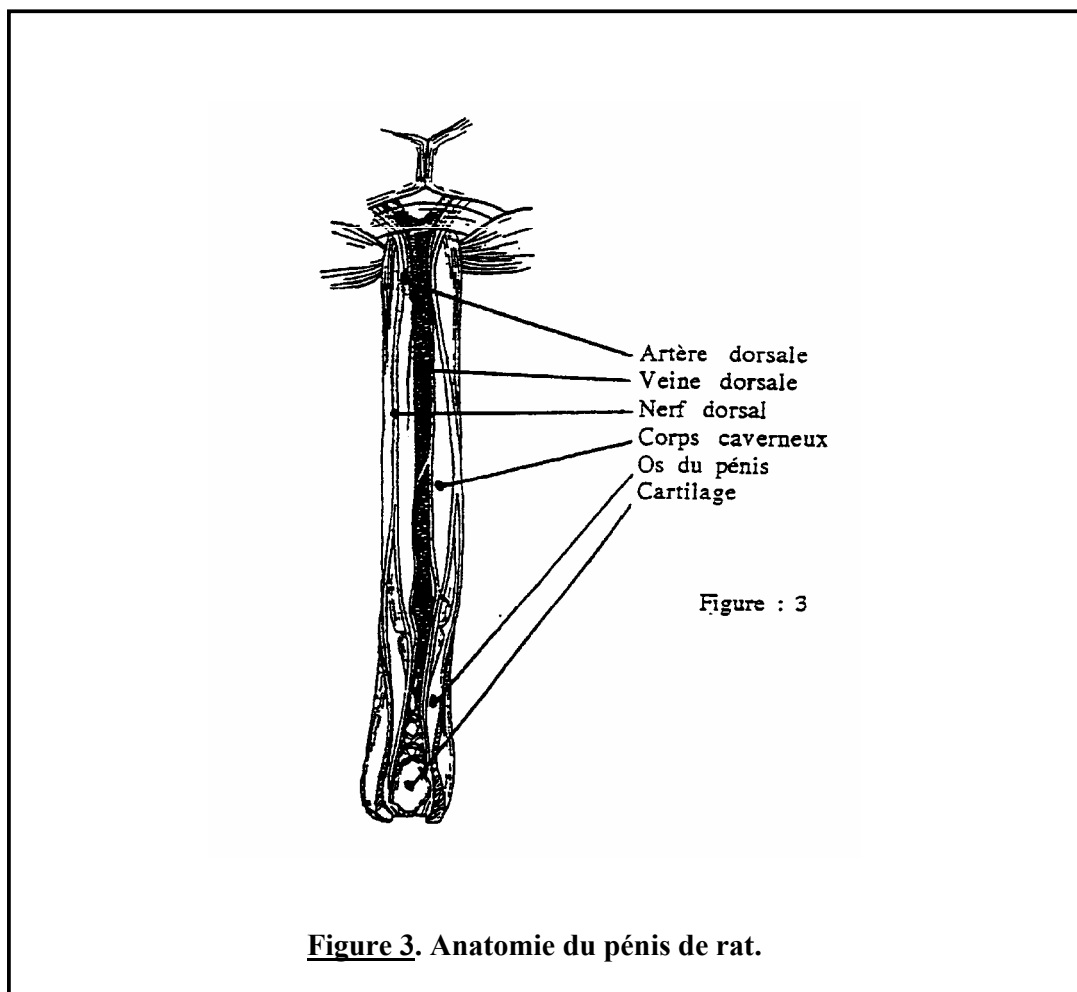


Figure : 2

Figure 2. Anatomie trachéale du rat.



L'enregistrement de la PA est réalisée par une acquisition informatique afin d'améliorer la précision de la détermination des paramètres hémodynamiques (voir figure 4 page suivante). Le logiciel utilisé (Chart 5, ADI instrumentation) permet d'enregistrer en continu la PA mais également de calculer la fréquence cardiaque (FC) et la pression artérielle moyenne (PAM) une fois l'enregistrement terminé.

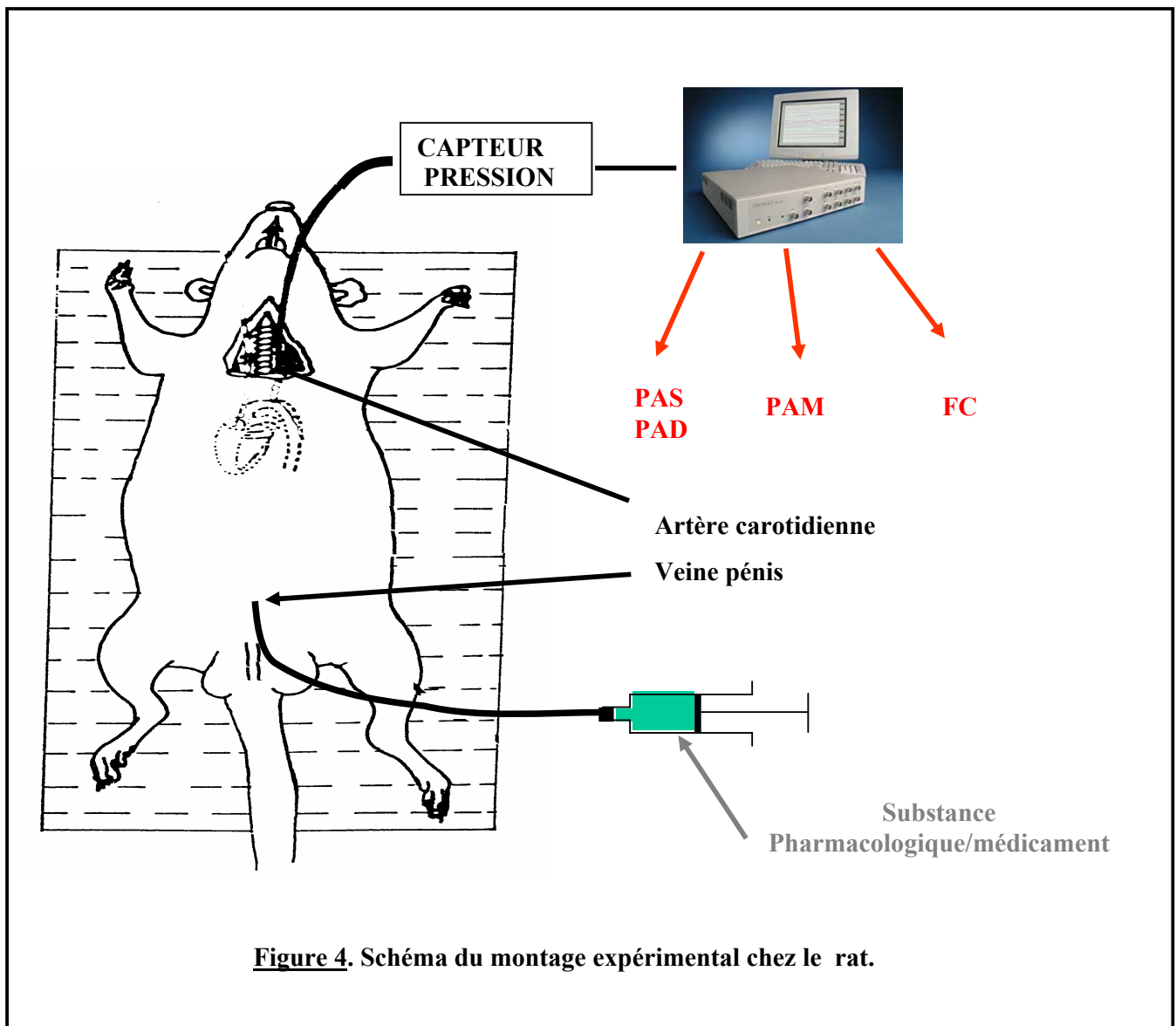


Figure 4. Schéma du montage expérimental chez le rat.

III- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

- A partir de la veine du pénis, il va s'agir d'injecter différentes substances pharmacologiques et d'observer leurs effets sur la PA, la PAM et sur la FC.
- Les concentrations des substances présentes dans les différents bêchers mis à votre disposition sont les suivantes :
 - Isoprénaline (ISO) : 2 et 4 $\mu\text{g/ml}$
 - Noradrénaline (NA) : 2 $\mu\text{g/ml}$
 - Propranolol : 1mg/ml
 - Phénoxybenzamine (PBZ) : 5 mg/ml

- Afin de réaliser convenablement le protocole expérimental, certaines précautions doivent être prises par l'expérimentateur :
 - Procéder à l'introduction de la seringue dans la canule du pénis environ 2 min avant l'injection de la substance.
 - Après l'injection, ne pas oublier de vider la canule (volume mort) avec 0,1 ml de sérum physiologique. Cette vidange doit être réalisée rapidement pour éviter d'observer un deuxième effet de la substance.
 - Suivre **impérativement l'ordre d'injection** présenté ci-dessous et **attendre que la PA se stabilise** avant de procéder à une nouvelle injection.

Ordre du protocole expérimental

A effectuer après démarrage de l'enregistrement du tracé de la pression artérielle (icône «start» du logiciel).

Avant l'injection d'une substance pharmacologique dans la veine du pénis, un marqueur sera ajouté sur le tracé de pression (ligne pointillée verticale). Ce marquage sera réalisé grâce à l'utilisation des différentes fonctions F du clavier de l'ordinateur (F2 à F9), chacune correspondant à une dose de la substance étudiée.

1) Injecter le volume d'ISO nécessaire pour obtenir une dose de 1 µg/kg (fonction F2 sur le clavier) puis 2 µg/kg (fonction F3 sur le clavier).

2) Injecter le volume de NA nécessaire pour obtenir une dose de 1 µg/kg (fonction F4 sur le clavier) puis 2 µg/kg (fonction F5 sur le clavier).

3) Injecter le volume de propranolol nécessaire pour obtenir une dose de 0,5 mg/kg (fonction F6 sur le clavier). Si aucun effet significatif n'est observé par cette dose, injecter alors 1 mg/kg (fonction F7 sur le clavier).

4) Injecter le volume de PBZ nécessaire pour obtenir une dose de 1 mg/kg (fonction F8 sur le clavier).

5) Répéter les 2 injections d'ISO expliquées dans le paragraphe 1 puis injecter une dose de 4 µg/kg (fonction F9 sur le clavier).

6) Répéter les 2 injections de NA expliquées dans le paragraphe 2.

A la fin du protocole expérimental, cliquez sur l'icône « **stop** » afin d'arrêter l'enregistrement de la PA et ensuite sauvez-le en cliquant sur l'icône représentant une disquette.

Les tracés de PAM et de FC permettront de déterminer les résultats demandés dans le tableau du compte-rendu. Pour faciliter la détermination, une mise en place de marqueurs sur les tracés pourra être réalisée (demander à l'enseignant une démonstration).

IV- COMPTE-RENDU A REMETTRE

IV-1- Présentez les objectifs et les méthodes de l'expérimentation réalisée chez le rat anesthésié.

IV-2 Consignez les résultats obtenus dans le tableau suivant :

Une augmentation de la PAM ou FC sera notifiée avec un signe (+) et une diminution avec un signe (-). Cette détermination graphique peut être réalisée sur les tracés grâce à la mise en place de marqueurs (demander à l'enseignant une démonstration).

		Δ PAM (mm Hg)	Δ FC (bts/min)
ISO	1 μ g/kg		
	2 μ g/kg		
NA	1 μ g/kg		
	2 μ g/kg		
Propranolol	0,5 mg/kg		
PBZ	1 mg/kg		
ISO	1 μ g/kg		
	2 μ g/kg		
	4 μ g/kg		
NA	1 μ g/kg		
	2 μ g/kg		

Remarque : Δ représente la variation maximale (positive ou négative) du paramètre étudié après l'injection de la substance pharmacologique par rapport à celui mesuré ou déterminé juste avant cette injection.

IV-3- Répondez de façon concise aux questions suivantes :

IV-3-1 Expliquez les mécanismes pharmacologiques (récepteurs et couplages) à l'origine des modifications des paramètres hémodynamiques induites par les différentes doses de noradrénaline et d'isoprénaline.

IV-3-2 Expliquez les effets aigus du propranolol sur les paramètres hémodynamiques du rat. A quoi sert l'injection de phénoxybenzamine après celle du propranolol ?

IV-3-3 A partir des informations présentées dans la figure 1, donnez les effets chroniques du propranolol et suggérez les différents mécanismes pharmacologiques impliqués dans cette réponse.

IV-3-4 D'après les résultats obtenus, est-ce que le propranolol possède une activité sympathomimétique intrinsèque (ASI) ? Justifiez votre réponse.

IV-3-5 Suggérez la nature de l'antagonisme obtenu par le propranolol sur le récepteur β -adrénergique.

Remarques :

- Notez dans votre rapport le nom de l'enseignant qui a encadré votre TP.
- Insérez dans votre rapport une impression de l'ensemble de votre enregistrement de la PAM et de la FC (effectuée uniquement par l'enseignant).

PHARMACOLOGIE DU SYSTEME CARDIOVASCULAIRE**Travaux Pratiques Intégrés :****Evaluation des effets pharmacologiques de la nifédipine
sur une préparation artérielle isolée****I- INTRODUCTION ET OBJECTIFS**

La contraction des vaisseaux est soumise à une régulation nerveuse par le système nerveux sympathique notamment et à une régulation humorale (par des facteurs libérés dans la circulation sanguine ou localement au sein même des tissus vasculaires ou cardiaques). Cette contraction survient lorsque la concentration calcique intra-cytoplasmique de la cellule musculaire lisse augmente. L'ouverture de canaux calciques membranaires intervient notamment dans ce processus. Certains **médicaments**, tels que les dihydropyridines (exemple : la **nifédipine**), possèdent la propriété de bloquer ces canaux calciques, inhibant ainsi l'influx calcique dans la cellule et réduisant le tonus contractile du vaisseau. Ces inhibiteurs d'influx calcique sont utilisés en **thérapeutique cardiovasculaire**, notamment comme anti-hypertenseurs et anti-angoreux.

L'objectif de cette étude consiste à évaluer et comparer les effets pharmacologiques de la nifédipine synthétisée par les étudiants sur une réponse contractile induite par une solution physiologique hyperpotassique et par un agoniste des récepteurs α -adrénergiques.

II- MATERIELS ET METHODES

En pharmacologie vasculaire, un des modèles couramment utilisé est celui d'un vaisseau de conductance, l'aorte thoracique. Contrairement aux artères de résistance, ce type d'artère n'est pas directement impliqué dans la régulation de la pression artérielle. Néanmoins, il constitue un modèle expérimental facile d'utilisation permettant d'analyser le rôle de divers médiateurs impliqués dans le contrôle de la vasomotricité. Le modèle utilisé ici est l'anneau d'aorte isolée de rat monté dans un **système de cuves à organe isolé**.

Prélèvement et montage des anneaux d'aorte de rat (réalisés par l'enseignant)

Le rat* est sacrifié par dislocation cervicale. L'aorte thoracique est prélevée, nettoyée de son tissu adipeux et coupée en anneaux de 3 mm de longueur dans une solution saline physiologique (PSS) de Krebs (composition en mM: NaCl 118,4 ; KCl 4,7 ; NaHCO₃ 25 ; glucose 11,1; CaCl₂ 2,5 ; KH₂PO₄ 1,2 ; MgSO₄ 1,2). Pour tous les anneaux, l'endothélium est enlevé mécaniquement en faisant passer délicatement la pointe d'une pince droite à l'intérieur du vaisseau.

* Le laboratoire de Pharmacologie de l'UFR de Pharmacie est un établissement agréé pour l'expérimentation animale (agrément n° A33049, délivré par la Préfecture de Gironde).

Les anneaux d'aorte sont ensuite montés sous une tension statique de 1 g dans 4 **cuves à organe isolé** contenant 10 ml d'une solution physiologique de Krebs maintenue à 37°C et oxygénée. L'anneau est tendu entre une tige fixe et une tige métallique reliée à un capteur de tension isométrique.

La tension développée par l'anneau est mesurée par le capteur de tension, amplifiée et retranscrite sur un enregistreur papier pour que l'étudiant visualise l'ensemble des données brutes. D'autre part, les données sont enregistrées à l'aide d'une acquisition informatique de façon à pouvoir traiter les résultats bruts par différents logiciels.

Pour équilibrer les préparations, celles-ci sont lavées toutes les 20 minutes pendant au moins 1 heure avant le début des expériences.

III- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

III-a- Principe général

Les anneaux d'aorte seront d'abord précontractés soit par une solution saline hypotassique K-PSS (composition en mM: NaCl 44 ; KCl 80 ; NaHCO₃ 25 ; glucose 11,1; CaCl₂ 2,5 ; KH₂PO₄ 1,2 ; MgSO₄ 1,2) soit par un agoniste (phényléphrine) afin d'étudier l'effet relaxant de la nifédipine. Les propriétés pharmacologiques de ces différentes substances sont précisées dans le tableau suivant.

Molécules	Propriété pharmacologique
<i>Phényléphrine</i>	agoniste des récepteurs α_1 -adrénergiques
<i>Nifédipine</i>	bloqueur des canaux calciques de type L ($Ca_v 1.2$)

Tableau 1 : Propriétés des agents pharmacologiques étudiés.**III-b- Calculs et préparation des dilutions des substances pharmacologiques**

Pour chaque substance étudiée, vous avez à votre disposition une solution-mère. Vous devez préparer, à partir de ces solutions-mères, des dilutions intermédiaires (avec la solution de Krebs) afin d'obtenir les concentrations finales dans la cuve (précisées dans le tableau 2) tout en sachant que le volume injecté dans la cuve doit être compris entre 5 et 50 μ l (c'est-à-dire compris entre 0,1 et 1% du volume de la cuve).

Substances	Concentration de la solution mère	Concentrations finales dans la cuve
<i>Phényléphrine</i>	10^{-2} M	10^{-7} M
<i>Nifédipine</i>	10^{-2} M	10^{-9} , 3.10^{-9} , 10^{-8} , ... jusqu'à 10^{-6} M

Tableau 2 : Concentrations des solutions mères et concentrations finales dans la cuve des substances à étudier.

Rmq : volume de la cuve = 5 ml

Avec la nifédipine, vous allez réaliser des **courbes concentration-effet cumulatives** sur la contraction induite par la solution hyperpotassique et par la phényléphrine. Dans ce cas, il faut tenir compte du phénomène d'addition cumulative de ces substances, c'est-à-dire qu'entre chaque concentration ajoutée dans la cuve, aucun lavage ne sera effectué. Il faut donc réaliser plusieurs dilutions intermédiaires de la solution mère pour injecter des volumes de la substance étudiée compris entre 5 et 50 μ l maximum. Ces volumes sont donc variables en fonction de la concentration finale dans la cuve et de la dilution de la solution intermédiaire.

Pour éviter tout risque d'erreur, il est fortement conseillé d'établir un tableau comprenant pour chaque concentration finale désirée dans la cuve, la dilution de la solution intermédiaire à utiliser et le volume correspondant à injecter dans la cuve.

III-c- Effets de la nifédipine sur la contraction à la phényléphrine

- Injectez dans la cuve N°1 la phényléphrine à la concentration finale de 10^{-7} M.
- Lorsque la contraction induite par la phényléphrine a atteint un plateau, injectez dans la cuve des concentrations cumulatives de nifédipine (concentration finale : 10^{-9} , 3.10^{-9} ... jusqu'à 10^{-6} M).

III-d Effets de la nifédipine sur la contraction induite par la solution dépolarisante

- Remplacer dans la cuve N°2 la solution physiologique présente par la solution hyperpotassique.
- Lorsque la contraction a atteint un plateau, injectez dans la cuve des concentrations cumulatives de nifédipine (concentration finale : 10^{-9} , 3.10^{-9} ... jusqu'à 10^{-6} M).

IV- COMPTE-RENDU

- Mesurez puis reportez dans un tableau les amplitudes (en g) de relaxation obtenues pour la nifédipine sur les deux anneaux. Exprimez les effets observés en % de la contraction induite par la phényléphrine ou par la solution hyperpotassique, 100% de contraction correspondant à la contraction induite par la phényléphrine ou par la solution hyperpotassique. Tracez les courbes concentration-effet correspondantes.

- Déterminez et comparez les paramètres pharmacologiques de la nifédipine sur la contraction induite par la phényléphrine ou par la solution hyperpotassique.

- A partir d'un schéma annoté, expliquez les mécanismes d'action des substances pharmacologiques étudiées au cours de la séance.

Remarques :

- Notez dans votre rapport le nom de l'enseignant qui a encadré votre TP.
- Insérez dans votre rapport une impression des tracés bruts de contraction obtenus (effectuée uniquement par l'enseignant).