

Université d'Alexandrie



# Formation à l'Expérimentation Animale

Auteur: Abeer El Wakil

2009/2010

Auteur :

Abeer ELWAKIL, Ph.D.

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire

CNRS UMR 6097

FRANCE

2009/2010



## Physiologie générale

La physiologie animale est l'étude du fonctionnement des animaux. Elle s'intéresse au fonctionnement des tissus, des organes, et des systèmes des animaux pluricellulaires en essayant de comprendre quels sont les mécanismes qui agissent à tous les niveaux chez les organismes vivants. La confrontation avec le besoin de survivre a provoqué de nombreuses variations reposant sur le thème de la vie. De plus, les environnements dans lesquels la vie s'est exprimée sont eux-mêmes très variés.

### Adaptation, acclimatation et naturalisation :

La physiologie de l'animal est généralement parfaitement associée à l'environnement qu'il occupe, ce qui lui permet d'assurer sa survie. Cette condition résulte de l'évolution par une sélection naturelle, c'est l'**ADAPTATION**. Pour une espèce, l'adaptation a lieu avec extrême lenteur, sur des milliers de générations ; elle est généralement irréversible. Les adaptations sont souvent confondues avec deux autres processus, l'acclimatation et la naturalisation. L'**ACCLIMATATION** est un changement physiologique, biochimique, ou anatomique de chaque animal, qui résulte de l'exposition chronique de l'animal à des conditions nouvelles, d'origines naturelles, de l'environnement dans lequel est né l'animal. La **NATURALISATION** est proche de l'acclimatation, mais les changements sont produits expérimentalement en laboratoire.

Généralement les deux processus sont réversibles. Par exemple, si un animal migre volontairement d'une vallée de montagne vers les pentes d'une haute montagne (c'est un changement volontaire d'environnement naturel), sa ventilation pulmonaire va augmenter au début pour fournir la quantité adéquate de l'oxygène. Après quelques jours ou semaines, cependant, la ventilation pulmonaire commence à diminuer jusqu'à sa valeur au niveau de la mer, tandis que les autres paramètres qui facilitent les échanges gazeux en haute altitude commencent à agir. Après plusieurs jours, chaque animal est dit *acclimaté* au nouvel environnement en altitude. Cependant, si un physiologiste place le même animal dans un caisson hypobare, qui simule les conditions de haute altitude, l'animale se commode aux conditions expérimentales en quelques jours. Cette réponse à court terme s'oppose à la capacité d'adaptation de l'oie sauvage qui peut voler au-dessus des sommets du Mont Everest. Cette oie a subit une adaptation à la haute altitude à la suite de la sélection naturelle des espèces.

Les adaptations physiologiques et anatomiques à l'environnement ont des bases génétiques, transmises de générations en générations et constamment réajustées et maintenues par la sélection naturelle. Les animaux héritent de l'information génétique de leurs parents sous la forme de l'ADN. Des modifications spontanées -mutations- peuvent survenir dans les séquences

de nucléotides de l'ADN, produisant potentiellement des changements de propriétés des protéines codées ou des acides ribonucléiques (ARN).

### **Homéostasie :**

Les changements de conditions environnementales qui perturbent le milieu dans lequel vit l'animal, peuvent constituer une force majeure de désorganisation de la fonction cellulaire, tissulaire ou organique. Toutefois, ces changements n'altèrent pas les systèmes de contrôle physiologique qui sont destinés à maintenir des conditions relativement stables au sein des tissus du corps d'un animal. Cette tendance des organismes à maintenir une stabilité interne relative est appelée l'**HOMEOSTASIE**. Ce phénomène est pratiquement universel pour les systèmes vivants en leur permettant de survivre dans des environnements stressants et variés. En fait, les degrés variés de l'homéostasie se trouvent dans la plupart des organismes simples. Par ex., les protozoaires ont été capables d'envahir l'eau douce, et de supporter d'autres stress osmotiques environnementaux, grâce à la régulation des concentrations en sels, en sucres et en acides aminés, assurée par la perméabilité de leur membrane, par le transport actif ou par d'autres mécanismes.

### **Facteurs qui aident à l'homéostasie :**

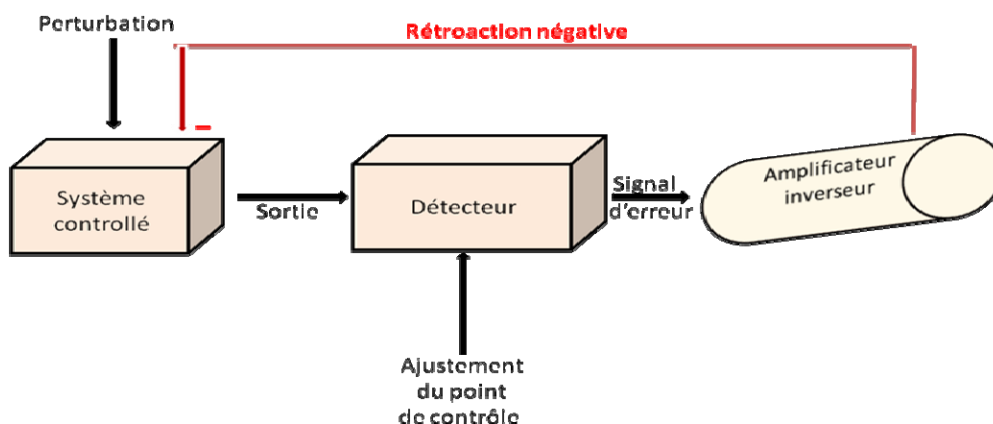
Le processus de la régulation qui maintient l'homéostasie des cellules et des organismes pluricellulaires dépend d'**une rétroaction** (le plus souvent appelée **feed-back**). Celle-ci se produit quand l'information sensorielle concernant une variable particulière (comme la température, la salinité, le pH) contrôle les processus cellulaires, tissulaires ou organiques qui influencent la valeur interne de cette variable.

La régulation homéostatique nécessite un échantillonnage continu des variables contrôlées et du mécanisme correcteur, ce que l'on nomme une **rétroaction négative**. Un exemple de régulation utilisant une rétroaction négative peut être démontré à partir de l'appareillage thermostatique qui maintient la température de l'eau chaude à une valeur prédéterminée. Quand la température de l'eau est en-dessous de la valeur sélectionnée, le détecteur maintient le commutateur de chauffage en position fermée. Aussitôt que la valeur de la température présélectionnée est atteinte par le réchauffement de l'eau, le commutateur de chauffage est ouvert, et interrompt le chauffage, jusqu'à ce que la température chute en dessous de la valeur choisie. Cet exemple suggère que la régulation de la température du corps a besoin d'un thermostat dont l'information peut être donnée à un système de contrôle de température. Ce système peut, selon le signal, soit chauffer soit refroidir le corps.

Ce phénomène peut aussi être illustré en supposant qu'un système contrôlé **A** détecte une perturbation nouvelle (comme un changement de longueur, de température, de voltage ou de concentration). La sortie du système est reliée à un détecteur qui envoie un signal à un amplificateur (**figure 1**). Imaginons maintenant un amplificateur qui inverse le signal qu'il reçoit, de sorte que le signe à la sortie est de valeur opposée à celui de l'entrée (le +ve devient -ve et inversement). Une telle inversion de signal constitue la base d'une rétroaction négative utilisée pour régler un système contrôlé dans une certaine marge. Quand la détection perçoit un changement d'état venant du système contrôlé, il délivre un signal d'erreur proportionnel à la différence entre la valeur de référence à laquelle le système doit être maintenu, et l'état réel du système. La sortie inversée de l'amplification retourne un signal destiné à compenser la perturbation. L'inversion du signe est la propriété la plus importante de la rétroaction négative. Cette inversion, en compensant la perturbation, réduit le signal d'erreur et le système tend à se stabiliser près de la valeur de référence.

La rétroaction négative ne fait que s'approcher du point de référence après une perturbation. Ainsi, si l'amplification est faible, la précision du contrôle sera également faible.

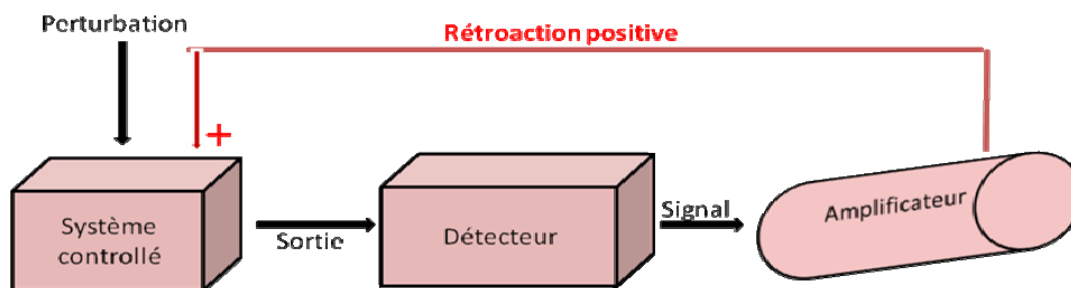
**Fig. 1 : Système Contrôlé A**



**La rétroaction positive;** dans un autre modèle **B**, une perturbation agit sur le système contrôlé comme en **A**. Supposons cependant que l'amplificateur ne change pas le signe du signal qu'il reçoit du système (**figure 2**). Dans ce cas, la sortie de l'amplificateur, lorsqu'elle renvoie un signal au système, produit le même effet que la perturbation elle-même et en renforce l'effet sur le système. Une telle rétroaction est très instable, car le système de sortie devient de plus en plus grand au fur et mesure qu'il est retourné au système et amplifié à nouveau. Un exemple familier est celui des mégaphones. Quand ce qui sort du haut-parleur est capté par un microphone puis ré-amplifié, il en résulte un bruit très fort. Ainsi une faible variation à l'entrée peut produire un effet

important à la sortie. Il existe, de toute façon, un système de limitation dû à la puissance de l'amplificateur et des hauts parleurs, ou encore résultant d'une saturation du signal. Dans les systèmes biologiques, la réponse peut être limitée par la quantité d'énergie ou de substrat disponible.

**Fig. 2 : Système B**



Chez les animaux normaux, en bonne santé, une rétroaction positive produit généralement un effet régénérateur, explosif ou autocatalytique. Ce type de contrôle est souvent utilisé pour produire une phase ascendante dans un phénomène cyclique comme le potentiel d'action de l'influx nerveux, ou la croissance explosive d'un clou plaquettaire limitant la perte de sang. Le vidage rapide d'une cavité du corps (comme l'expulsion du fœtus hors de l'utérus, le vomissement, la déglutition) débute souvent par un processus de rétroaction positive.

La rétroaction positive est cependant observée le plus souvent dans des situations pathologiques qui affectent la rétroaction négative. Une anomalie de vascularisation cardiaque constitue un exemple classique. Dans cette maladie, le cœur est incapable de pomper le sang, ce qui produit une accumulation dans les ventricules et neutralise leur possibilité de pomper le sang donc produit encore plus d'accumulation de sang, etc.

### **Méthodes expérimentales de la physiologie :**

Quand il prépare son expérience, le physiologiste doit d'abord prendre une décision importante en ce qui concerne le niveau auquel il souhaite réaliser son analyse. Ce choix du niveau détermine la méthodologie (et le choix de l'animal) appropriée pour mesurer les variables expérimentales intéressantes.

Au cours des dernières décades, et de plus en plus rapidement, de nouvelles techniques d'expérimentation au niveau des cellules puis des molécules ont apparus.

### Marquage des molécules avec des radio-isotopes.

La connaissance des déplacements des molécules dans les cellules, apporte beaucoup à la compréhension des processus physiologiques. Ainsi, nous pouvons mieux comprendre le rôle d'une neuro-hormone dans la régulation des processus physiologiques si ses mouvements ont pu être tracés depuis son site de synthèse jusqu'à son lieu de libération, puis jusqu'à son site d'action. Beaucoup d'expériences destinées à suivre les déplacements des molécules importantes en physiologie utilisent des radio-isotopes (isotopes relativement instables des éléments chimiques qui sont radioactifs en se désintégrant). La désintégration naturelle des radio-isotopes s'accompagne d'une libération des particules à haute énergie qui peuvent être détectées par des instruments appropriés.

Bien que les radio-isotopes se forment naturellement, ceux que l'on utilise dans les études expérimentales sont produits par des réacteurs nucléaires. Les isotopes les plus fréquemment utilisés en recherche biologique sont  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{45}\text{Ca}$  et  $^3\text{H}$ . Un radio-isotope d'un élément normalement présent dans une molécule intéressante peut être incorporé *in vivo* ou *in vitro*, directement dans la molécule, ou dans l'un de ses précurseurs qui sera éventuellement converti en cette molécule. La molécule ainsi marquée *radio activement* possède les mêmes propriétés chimiques et biochimiques que la molécule non marquée. Une liste impressionnante de molécules biologiquement actives marquées (comme des acides aminés, des sucres, des hormones, des protéines) est actuellement disponible dans des entreprises spécialisées dans leur production. Une fois que les molécules ont été marquées, les particules émises par les radio-isotopes peuvent être utilisées pour détecter la présence de ces molécules, même à de très faibles concentrations.

Lors d'une de ces expériences de traçage, la molécule intéressante marquée, ou son précurseur, est administrée à un animal, à un organe isolé, ou à des cellules qui se développent *in vitro*; des échantillons sont prélevés périodiquement pour mesurer l'émission des particules. Deux types d'instruments sont utilisés pour détecter les particules émises ; le **compteur Geiger** qui détecte l'ionisation produite par l'énergie émise dans un gaz. Le **compteur à scintillation**, qui détecte et compte les très petites scintillations lumineuses produites par les particules qui traversent un liquide à scintillation spéciale. La quantité de radiation détectée par chaque instrument dépend directement de la quantité de molécules marquées présentes dans l'échantillon.

Dans un autre type d'expérience, la localisation des molécules marquées dans une section de tissu est indiquée par l'**autoradiographie**. Dans cette technique, qui réalise littéralement une photographie des radio-isotopes dans les tissus, une coupe fine de tissu contenant le radio-isotope est laissée pour un certain temps en contact avec l'émulsion d'une plaque photographique. Après quelques jours ou quelques semaines, les particules émises par l'isotope ont exposé l'émulsion, produisant des grains noirs qui correspondent à la localisation des molécules marquées dans le tissu (**figure 3**). Cet enregistrement qualitatif peut être quantifié en mesurant la quantité d'émulsion exposée à l'aide **d'un densitomètre** et en la comparant à l'exposition faite par des

témoins de concentration réelle de la molécule marquée dans les tissus, ou sur des régions plus restreintes. Cette méthode est utile en neurobiologie et d'autres domaines.

**Fig. 3:** Autoradiographie en microscopie électronique d'une cellule épithéliale provenant d'un animal auquel la thymidine tritiée a été administrée quatre jours auparavant. L'incorporation de thymidine tritiée dans le noyau, résulte d'une synthèse d'ADN utilisant cette base nucléotidique. Elle signe l'apparition d'une cellule nouvellement formée.

(M. Chrétien et M. Pisam, *Biol. of the Cell*, 56, 137-150, 1986.)



### Traçage des molécules avec des anticorps monoclonaux.

La meilleure façon de voir plus des détails structuraux dans les cellules est obtenue par le marquage des anticorps qui permet la localisation des molécules présentes à des concentrations extrêmement faibles et difficilement détectables avec d'autres techniques. Ce marquage implique généralement la fixation d'un colorant fluorescent, par une liaison de covalence sur l'anticorps qui reconnaît spécifiquement le déterminant spécifique d'une molécule d'antigène. Il est souvent mentionné que les antigènes sont des matériaux étrangers à l'organisme comme le pollen, ou des générateurs de maladies microbiennes. Il existe aussi des molécules normales, comme les molécules biologiquement actives, tel que les neurotransmetteurs et les régulateurs de croissance cellulaire, qui agissent comme des antigènes et induisent la production d'anticorps spécifiques quand ils sont injectés à l'animal convenable. Les anticorps identiques, produits en présence d'un même antigène, sont dit anticorps **monoclonaux**; cependant la plupart des antigènes naturels ont généralement des déterminants multiples et ainsi font produire différents types d'anticorps. Un mélange d'anticorps reconnaissant différents déterminants antigéniques est dit **polyclonal**. Une fois les anticorps qui ont reconnu les sites spécifiques de la molécule intéressante, ont été produits, puis liés à une autre molécule colorante fluorescente, ils peuvent être injectés dans une cellule ou des tissus pour les étudier.

**Le génie génétique :** est une approche utilisée pour offrir de nouvelles perspectives en physiologie. Elle commence par l'identification d'un gène de structure qui code une protéine spécifique à partir de l'ADN isolé de l'organisme sous question. Ainsi, le gène codant l'insuline humaine peut être identifié dans des cellules humaines. La région contenant le gène d'intérêt peut être coupée, sur la longue chaîne du brin d'ADN humain. Elle est ensuite insérée dans un *vecteur clonal* (un élément d'ADN qui peut se multiplier dans des cellules hôtes, indépendamment de l'ADN de ces cellules). L'insertion d'un fragment d'ADN étranger (comme



le gène de l'insuline humaine) dans un vecteur de clonage forme un recombinant d'ADN (une molécule d'ADN contenant de l'ADN ayant deux ou plusieurs origines).

Les plasmides bactériens sont une variété commune de vecteurs de clonage. Les plasmides ont un ADN circulaire extrachromosomal et se multiplient eux-mêmes dans la bactérie. Sous certaines conditions, un plasmide recombinant contenant un gène intéressant est prélevé d'une bactérie commune, *Escherichia coli*. Ce procédé est appelé transformation (**figure 4**). Normalement, il n'y a qu'une seule molécule d'un plasmide qui est prélevée par une cellule bactérienne. Dans la cellule transformée, le plasmide incorporé peut se multiplier (tandis que la cellule se divise) en produisant un groupe de cellules identiques, **le clone**. Chaque cellule d'un clone contient au moins un plasmide avec le gène concerné. Cette procédure générale de génie génétique, appelée *clonage de gènes*, peut être utilisée pour constituer une bibliothèque formée de multiples clones bactériens contenant chacun un gène spécifique de l'homme ou d'autres espèces. Diverses variantes, du clonage de gènes sont utilisées selon la taille et le nombre de gènes de l'organisme étudié.

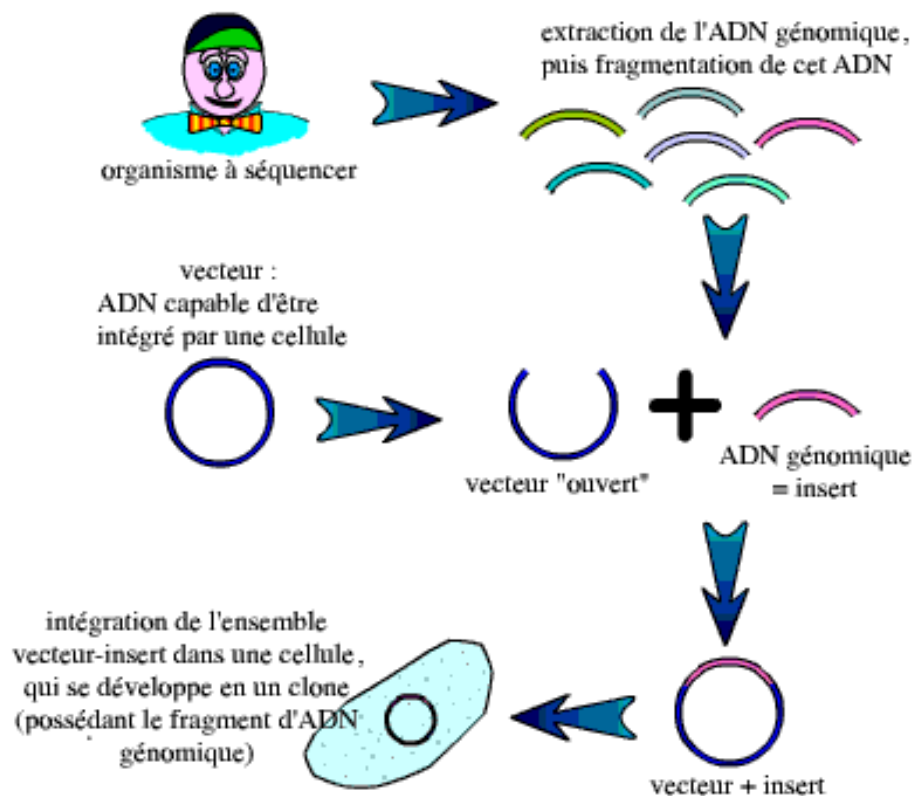


Figure 4

Les animaux transgéniques sont une autre forme de transformation d'un organisme par génie génétique, potentiellement susceptible d'apporter des contributions à la physiologie.

Un animal transgénique est un animal chez qui la constitution génétique a été modifiée expérimentalement en ajoutant ou en substituant des gènes provenant d'autres animaux de la même espèce ou d'espèces différentes. Les animaux transgéniques (surtout les souris) occupent la première place dans la ménagerie des modèles animaux, aidant les chercheurs à comprendre les processus physiologiques de base et les états pathologiques qui résultent de leur dysfonctionnement. Une des techniques utilisées pour produire des animaux transgéniques est l'injection de l'ADN étranger contenant le gène intéressant, appelé transgène, dans le noyau d'œufs fécondés (le plus souvent de souris) qui sont ensuite réimplantés chez des femelles en pseudo-gestation. Le transgène est incorporé à l'ADN chromosomal des embryons en développement, à une fréquence relativement faible. Les jeunes porteront ainsi le transgène dans leurs cellules somatiques (**figure 5**). Les souris exprimant le transgène se reproduiront ensuite pour former une lignée transgénique. Cette méthode d'approche est utilisée pour ajouter des gènes fonctionnels sous forme d'un gène qui n'existe normalement pas chez l'animal.

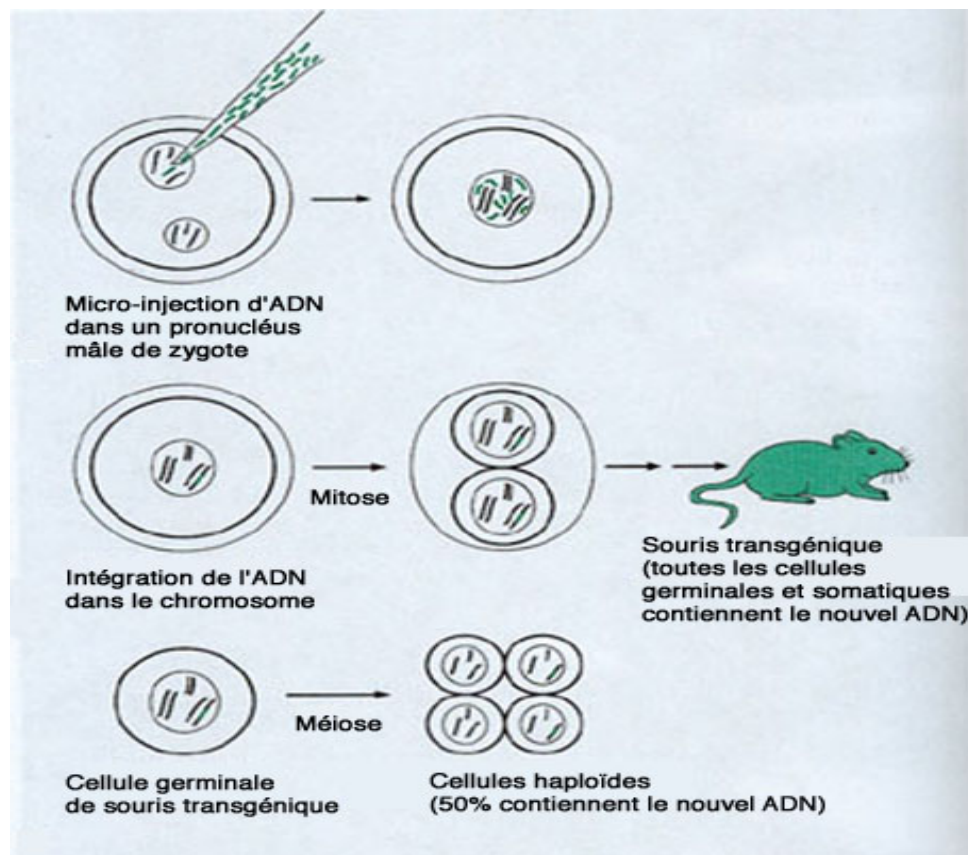


Figure 5

**Cultures cellulaires:**

Le maintien en survie des cellules *in vitro* (du latin "dans du verre") dans des récipients en verre ou en plastique est appelé la culture cellulaire. Historiquement, les explants (des petits morceaux de tissus prélevés d'un animal donneur) étaient maintenus en vie et se développaient dans des bouteilles remplies de solutions nutritives et de substances chimiques.

Aujourd'hui, le procédé le plus fréquent consiste à dissocier des petits fragments de tissu, puis de placer les cellules dissociées en suspension dans "une soupe" chimique contenant des produits nutritifs, dans laquelle les cellules se développent et se divisent comme des entités séparées.

La croissance cellulaire réussie, *in vitro*, nécessite un milieu de culture approprié (la solution dans laquelle les cellules sont en suspension).

Les cellules normales peuvent généralement se développer en quelques jours *in vitro*, ensuite elles cessent de se multiplier et éventuellement meurent. Une population relativement homogène de ces cellules est dite cellule souche. La culture des cellules souches (os et tissus conjonctifs; muscles lisses, squelettiques et cardiaques; tissu épithélial du foie, des poumons, du sein, de la peau, de la vessie et des reins; certains tissus nerveux; certaines glandes endocrines; la surrénale, l'hypophyse et les ilots de Langerhans du pancréas) est utile dans certains types d'expériences, mais leur durée de vie ne permet pas leur utilisation dans toutes les études. De plus, il existe encore beaucoup de types de cellules animales que l'on n'a pas réussi à cultiver. Au contraire des cellules animales normales, les cellules cancéreuses présentent habituellement un développement rapide et anarchique dans le corps et sont capables de se développer indéfiniment en culture. Le traitement de certaines cellules normales par certains agents peut les modifier de sorte qu'elles se comportent comme des lignées cellulaires des cellules cancéreuses isolées d'une tumeur. Ces cellules modifiées peuvent être cultivées indéfiniment. Les populations homogènes de telles cellules "immortelles" sont appelées *lignées cellulaires*.

**Référence :**

Physiologie animale mécanismes et adaptations, Roger Eckert; David Randall, Warren Bruggren, Kathleen French, traduction par, Francois Math, Alain Propper et Louis Henquell, De Broeck Université, 1999.