

TER de physiologie

Travaux pratiques

étude *in vitro* de la réactivité des voies aériennes

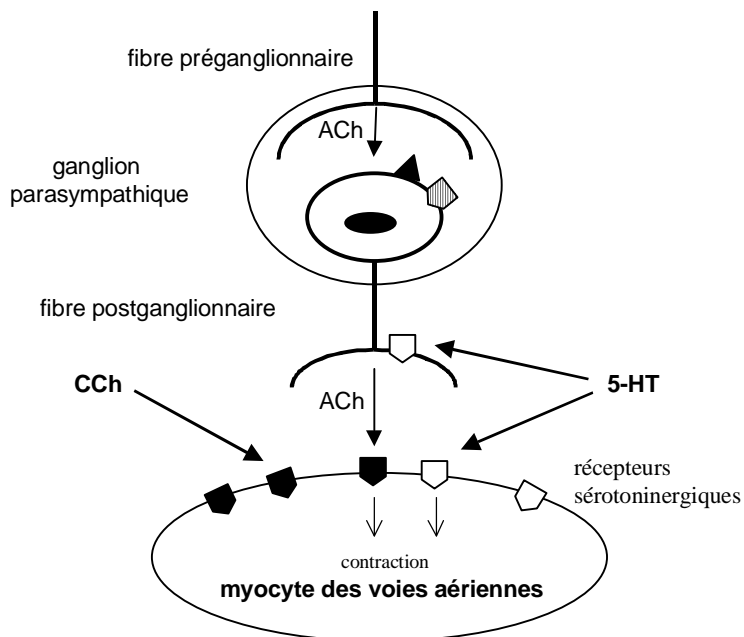
introduction	2
principe et déroulement du TP	2
principe	2
Principe de la mesure de la contraction isométrique	2
analyse de la courbe de réponse	3
objectifs	4
déroulement	4
organisation	4
1 ^{re} étape : stimulation cholinergique	5
2 ^e étape : stimulation sérotoninergique	5
utilisation des fichiers	5
obtention des données expérimentales	5
analyse des données	7
Feuilles « CCRC » :	7
feuilles « graphe » :	7
Feuilles « test » :	7
rédaction du compte-rendu	7

introduction

La réactivité bronchique est une fonction physiologique qui se définit par la tendance des voies aériennes à développer une obstruction bronchique modérée en réponse à une stimulation non spécifique induite par des stimuli soit directs – stimuli agissant directement sur le muscle lisse – soit indirects – agissant par libération secondaire de médiateurs d'origine épithéliale ou inflammatoire, ou par l'activation des voies nerveuses bronchoconstrictrices

La réactivité normale et pathologique des voies aériennes peut s'étudier in vivo – par des tests d'exploration fonctionnelle – mais également in vitro, par la mesure de la contraction isométrique d'anneaux isolés de bronches ou de trachée.

Le TP consiste à caractériser la réactivité des voies aériennes de rats à deux agonistes contractants, le carbachol (CCh, analogue de synthèse de l'acétylcholine (ACh)) et la sérotonine (5-hydroxytryptamine ou 5-HT), en analysant des tracés de contraction isométrique d'anneaux isolés.



L'ACh est le principal agent bronchoconstricteur. Elle est libérée au niveau des fibres nerveuses parasympathiques post-ganglionnaires, et agit sur des récepteurs présents sur la cellule musculaire lisse.

La 5-HT, chez le rat (mais pas chez l'homme), est présente dans les mastocytes pulmonaires. Elle agit directement sur la cellule musculaire lisse, mais également sur les fibres nerveuses post-ganglionnaires, où elle induit la libération d'ACh.

Figure 1 : effet du carbachol et de la 5-HT sur le myocyte des voies aériennes de rat

principe et déroulement du TP

principe

Le TP est un enseignement assisté par ordinateur qui simule les tracés expérimentaux de contraction isométrique d'anneaux de trachée de rat stimulés par différents agonistes.

Principe de la mesure de la contraction isométrique

Pour la mesure de la contraction isométrique, les anneaux sont placés entre deux agrafes dans une cuve à organes isolés analogue à celle utilisée lors du TP sur la réactivité vasculaire.

En début de manipulation, les anneaux sont étirés passivement jusqu'à une valeur égale à la précharge optimale (cf. cours et TD sur la contraction musculaire).

Une fois l'anneau stabilisé, une contraction initiale est effectuée en réponse à une concentration supramaximale d'acétylcholine (ACh), à 10^{-3} M. Dans le protocole suivi, cette contraction servira de contraction de référence pour l'anneau étudié, et les valeurs de contraction obtenues par la suite seront exprimées en pourcentage de cette contraction de référence.

Après rinçages jusqu'à retour à la ligne de base, l'anneau est stimulé par une série de concentrations cumulatives d'agonistes. Ceci permet la construction d'une courbe de réponses à des concentrations cumulatives (*cumulative concentration-response curve*, CCRC), qui caractérise la réponse contractile à l'agoniste étudié, et donc la réactivité des voies aériennes étudiées (cf. figure 2).

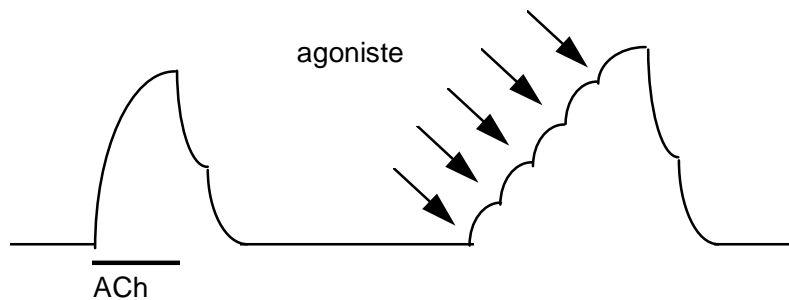


Figure 2 : construction d'une courbe de réponse à des concentrations cumulatives

analyse de la courbe de réponse

La force de contraction – exprimée en pourcentage de la réponse de référence à l'ACh – est exprimée en fonction de la concentration en agoniste. Lorsque la concentration d'agoniste est exprimée en logarithme, la courbe concentration-réponse décrit une sigmoïde, dont le plateau correspond à la force maximale, et le point d'inflexion à la concentration d'agoniste entraînant la moitié de la réponse maximale, ou EC_{50} (cf. figure 3).

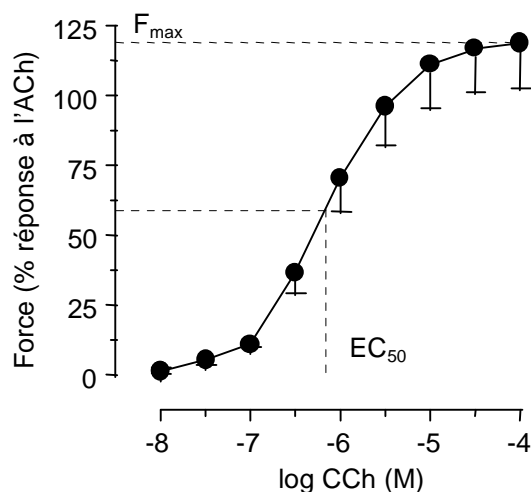


figure3 : courbe de réponse à des concentrations cumulatives de CCh.

F_{max} représente la force contractile maximale ;
 EC_{50} la concentration induisant la une contraction égale à $F_{max}/2$. La concentration d'agoniste est exprimé en logarithme décimal de la concentration molaire.
 Les barres verticales représentent la SEM (écart-type de la moyenne)

La courbe concentration-réponse est donc caractérisée par force maximale (souvent notée F_{max} ou T_{max}) et le point d'inflexion de la courbe (EC_{50}).

NB : le profil de la courbe dépend d'un troisième paramètre, correspondant à la pente de la courbe. Dans la plupart des cas, il est égal à 1. Ce paramètre ne sera pas étudié au cours de ce TP.

objectifs

Les objectifs des expérimentations sont les suivants :

1. *caractériser la réponse contractile à la stimulation cholinergique ;*
2. *déterminer les effets antagonistes de l'atropine à faibles et à fortes concentrations ;*
3. *caractériser la réponse contractile à la stimulation sérotoninergique ;*
4. *évaluer l'effet cholinergique indirect éventuel de la sérotonine.*

déroulement

1^{re} étape : stimulation cholinergique

construction des courbes de réponse à des concentrations cumulatives de carbachol.

CCRC au carbachol : les concentrations cumulatives utilisées vont de 10^{-8} M à 10^{-4} M, de demi-log en demi-log. On effectuera 4 expérimentations, et on déterminera la F_{\max} et l' EC_{50} de la CCRC.

Afin de vérifier que la réponse est liée à la stimulation des récepteurs muscariniques, on étudiera l'effet de l'atropine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, sur la réponse au carbachol. L'atropine sera étudiée à faibles et à fortes concentrations. En fonction des résultats obtenus à faibles concentrations, déterminer si l'atropine est un antagoniste compétitif ou non compétitif. En testant l'effet de l'atropine à fortes concentrations (à partir de 10^{-7} M, de M en M), déterminer la concentration la plus faible bloquant totalement la réponse au carbachol.

2^e étape : stimulation sérotoninergique

CCRC à la sérotonine (5-HT) : les concentrations cumulatives utilisées vont de 10^{-8} M à 10^{-4} M, de demi-log en demi-log. La 5-HT a un double effet : un effet direct sur le muscle lisse, par l'intermédiaire de récepteurs 5-HT₂, et un effet indirect par action sur les fibres nerveuses cholinergiques post-ganglionnaires qui vont alors libérer de l'ACh endogène qui va agir sur le muscle lisse. En utilisant l'atropine à la concentration convenable (à déterminer), on évaluera la part de l'effet direct de la 5-HT sur le muscle lisse et de son effet cholinergique indirect.

organisation

Le TP consiste à analyser des tracés expérimentaux correspondant à ces 4 conditions expérimentales, obtenus et visualisés par informatique par l'utilisation du logiciel Excel. Le TP comprend donc 4 fichiers Excel correspondant à 5 protocoles expérimentaux :

1. CCRC1 : CCRC au carbachol
2. CCRC2 : CCRC au carbachol + atropine
3. CCRC3 : CCRC à la sérotonine
4. CCRC4 : CCRC à la sérotonine + atropine

Pour chaque point de chaque étape, l'expérimentateur choisira les conditions expérimentales qui permettent de répondre à la question posée, et il analysera les tracés du fichier correspondant.

1^{re} étape : stimulation cholinergique

- réactivité *in vitro* au carbachol

a) calcul des volumes de solutions-mères à injecter dans les cuves.

En fonction des concentrations finales désirées pour construire la CCRC au carbachol, et des concentrations des solutions-mères de CCh (voir fichier « CCRC1 »), déterminer les volumes à injecter.

b) détermination des valeurs de la CCRC

Générer 4 tracés expérimentaux dans les mêmes conditions expérimentales.. Noter les valeurs de la contraction maximale en réponse à l'ACh et à chaque concentration cumulative de carbachol. En utilisant une feuille de calcul du fichier « analyse », déterminer graphiquement la Fmax et l'EC50. La moyenne et la SEM seront déterminées pour ces deux paramètres. Déterminer les valeurs de la CCRC moyenne (exprimée en pourcentage de la réponse maximale à l'ACh de référence), et tracer le graphique correspondant.

- effet de l'atropine sur la réponse au carbachol (fichier « CCRC2 »).

On étudiera de la même manière l'effet de l'atropine sur la contraction au carbachol.

On étudiera l'effet de l'atropine à faibles concentrations : 3×10^{-10} ; 10^{-9} et 3×10^{-9} M, et à fortes concentrations : à partir de 10^{-7} M, jusqu'à inhibition totale de la réponse contractile. Pour chaque concentration finale, déterminer une concentration de solution-mère, et un volume adéquat à injecter.

(Réaliser un tracé expérimental pour chaque condition.)

2^e étape : stimulation sérotoninergique

- réactivité *in vitro* à la sérotonine (fichier « CCRC3 »).

On étudiera la réactivité à la sérotonine en construisant la CCRC de la même manière que pour le carbachol (4 tracés).

- effet direct et/ou indirect de la sérotonine (fichier « CCRC4 »).

On évaluera l'effet direct de la sérotonine en se plaçant dans des conditions expérimentales où seul l'effet direct est mis en jeu. Les conditions expérimentales sont déduites des résultats précédemment obtenus (4 tracés).

utilisation des fichiers

L'ensemble des fichiers utilisés lors du TP est classé dans un dossier intitulé « TP CCRC ». il comprend :

- 4 fichiers Excel correspondant aux différentes conditions expérimentales ;
- 1 fichier Excel (analyse) permettant la visualisation des courbes, ainsi que le calcul des moyennes, écarts-types, SEM, et le test t de Student ;
- 1 fichier Word (aideccrc) qui décrit le TP et correspond au document papier.

obtention des données expérimentales

- ouverture du fichier voulu (ex : CCRC2)

le fichier s'ouvre sur une feuille qui comprend le protocole expérimental (figure 4).

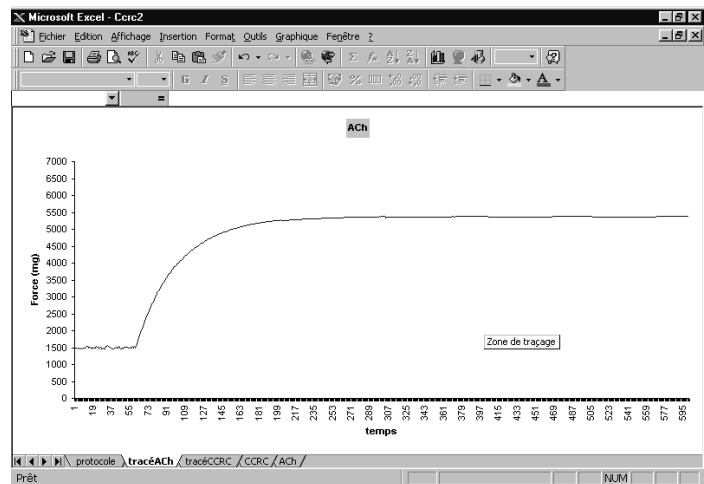
L'expérimentateur remplit les cases avec les valeurs correspondant à son protocole expérimental, ici le volume de solution-mère d'ACh à mettre dans la cuve pour la contraction de référence, les volumes cumulatifs de carbachol pour la construction de la CCRC, et le volume et la concentration de la solution-mère d'atropine correspondant à la concentration finale voulue.

figure 4

	B	C	D	E	F	G	H
1	précharge (mg)	CRC Carbachol + atropine					
2		1500					
3	ACh de référence	concentration (M)	volume (µl)				
4		1,00E-01					
5		solutions mères					
6	concentrations cumulatives	concentration (M)	volume (µl)	tracés			
7	concentration 1	1,00E-06					
8	concentration 2	1,00E-06					
9	concentration 3	1,00E-05					
10	concentration 4	1,00E-05					
11	concentration 5	1,00E-04					
12	concentration 6	1,00E-04					
13	concentration 7	1,00E-03					
14	concentration 8	1,00E-03					
15	concentration 9	1,00E-02					
16		volume de la cuve: 20 ml					
17	atropine	concentration (M)	volume (µl)				
18							
19							

Une fois la feuille de protocole remplie, la saisie d'une valeur (par exemple 1) dans la colonne *tracé* va générer 2 tracés expérimentaux liés, celui correspondant la contraction à l'ACh, l'autre à la réponse contractile aux concentrations cumulatives de carbachol.

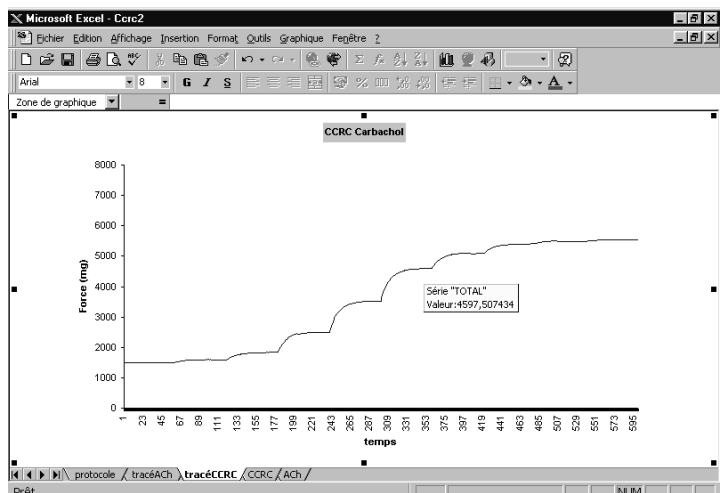
figure 5



Ces tracés sont visualisés dans les feuilles *tracéACh* pour la courbe de réponse à l'ACh (figure 5), et *tracéCCRC* pour la CCRC (figure 6).

En utilisant le curseur de la souris, on visualise la valeur de contraction sur le point voulu de la courbe. On détermine de cette manière la contraction pour chaque concentration d'agoniste.

figure 6



On détermine de cette manière les valeurs de la ligne de base, la contraction maximale à l'ACh, et la contraction maximale à chaque concentration cumulative d'agoniste.

analyse des données

Le traitement des données s'effectue en utilisant le fichier « analyse »
Il comprend 3 types de feuilles :

Feuilles « CCRC » :

elles permettent de calculer automatiquement les valeurs de la CCRC en % de la contraction à l'ACh. Pour cela, il suffit de remplir les cellules correspondantes.

- **CCRC1** : à utiliser pour l'analyse de la contraction au carbachol. La feuille calcule automatiquement la moyenne des 4 tracés expérimentaux.
- **CCRC2** : à utiliser pour l'analyse de l'effet de l'atropine. plusieurs colonnes sont disponibles, permettant de rentrer les valeurs correspondant à plusieurs concentrations d'atropine
- **CCRC3** : identique à la CCRC1 ; à utiliser pour analyser les effets de la sérotonine seule.
- **CCRC4** : identique à la CCRC3 ; à utiliser pour analyser les effets de la sérotonine + atropine.

feuilles « graphe » :

Elles permettent de visualiser les CCRC. Lorsque l'on rentre dans la colonne correspondante les valeurs de contraction, la courbe $F = f(\log[\text{Agoniste}])$ apparaît alors sur le graphe. On obtient une courbe sigmoïde dont le point d'inflexion correspond à l' EC_{50} , et le plateau à la F_{\max} . On détermine graphiquement ces valeurs (cf. figure 7)

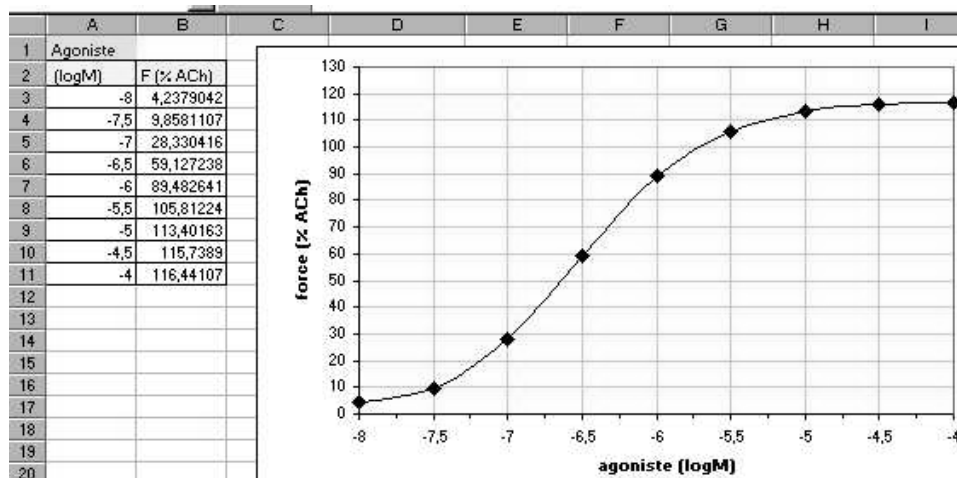


figure 7

Feuilles « test » :

elles permettent d'effectuer des tests t de Student, si on souhaite comparer statistiquement des valeurs (F_{\max} , EC_{50}). On rentre dans une colonne les valeurs correspondant à une condition expérimentale, et dans l'autre colonne celles correspondant à une autre condition expérimentale. La valeur de p est alors calculée. On conclura à la significativité si $p < 0,05$.

réduction du compte-rendu

Un compte-rendu succinct est rédigé. Les courbes obtenues dans les diverses conditions expérimentales sont comparées. Les résultats discutés.